

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**Estudio de los mecanismos
dependientes e independientes
de uniones adherentes que
regulan la función de barrera
endotelial durante la
inflamación**

DIEGO GARCÍA WEBER

MADRID, 2017

MEMORIA PRESENTADA POR
DIEGO GARCÍA WEBER,
LICENCIADO EN BIOLOGÍA,
PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN
BIOQUÍMICA, BIOLOGÍA MOLECULAR,
BIOMEDICINA
Y BIOTECNOLOGÍA

DIRECTOR DE LA TESIS:
Dr. JAIME MILLÁN MARTÍNEZ

Este trabajo ha sido realizado en el
Departamento de Biología Molecular.
Centro de Biología Molecular 'Severo Ochoa'
(CSIC-UAM)

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular
Severo Ochoa (CSIC-UAM) bajo la dirección del doctor Jaime Millán
Martínez, Científico Titular del CSIC.

La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a una beca
de Formación de Personal Investigador concedida a Diego García Weber por el Ministerio
de Economía y Competitividad.

A mi familia

A Deb

We are a way for the cosmos to know itself

Carl Sagan

El ojo que contempla el universo es el ojo del propio universo

Jostein Gaarder

ÍNDICE

ABREVIATURAS	19
RESUMEN	27
INTRODUCCIÓN	33
1. LA RESPUESTA INFLAMATORIA	35
1.1. Función de la respuesta inflamatoria en el organismo.....	35
1.2. El componente inflamatorio en las enfermedades humanas	37
1.3. Papel dinámico del endotelio vascular	38
1.4. El TNF y su señalización en el endotelio vascular.....	39
1.5. El TNF y el aumento de permeabilidad endotelial	40
1.6. Mediadores que comprometen la integridad endotelial en un ambiente inflamatorio	41
2. LA FAMILIA DE LAS RHO GTPASAS.....	42
2.1. Miembros de la familia de las Rho GTPasas, activación, inactivación, localización.	42
2.2. La subfamilia RhoA: Expresión, modificaciones post-traduccionales y localización, reguladores, efectores y funciones	44
2.3. Las Rho GTPasas son reguladores esenciales del citoesqueleto de actina en inflamación	45
2.4. Rac y la formación del frente de avance	46
2.5. Las Rho GTPasas son reguladores del tráfico vesicular.....	46
3. LAS UNIONES INTERCELULARES EN EL ENDOTELIO VASCULAR	47
3.1. Origen de las proteínas de uniones intercelulares. Transición de organismos unicelulares a organismos complejos. Tipos de cadherinas.....	47
3.2. Proteínas de uniones intercelulares en el endotelio vascular	48
3.2.1. Uniones adherentes: VE-cadherina y proteínas asociadas.....	48
3.2.2. Uniones oclusivas	50
3.3. Dinámica de VE-cadherina y disrupción de uniones intercelulares.	51
3.3.1. Síntesis, tráfico y degradación de VE-cadherina.	51

3.3.2. Mediadores inflamatorios y angiogénicos que inducen la internalización de VE-cadherina.....	51
4. BONE-MARROW STROMAL T-CELL ANTIGEN 2 (BST-2).....	53
5. ALTERACIÓN DE LA DINÁMICA DE VE-CADHERINA DURANTE LA INFECCIÓN DEL ENDOTELIO VASCULAR POR <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i>	55
OBJETIVOS.....	57
MATERIALES Y MÉTODOS.....	61
1. MATERIALES.....	63
1.1. Anticuerpos	63
1.1.1. Anticuerpos primarios.....	63
1.1.2. Anticuerpos secundarios	64
1.2. Reactivos.....	65
1.3. Plásmidos.....	66
1.4. Oligonucleótidos	67
1.4.1. Oligonucleótidos.....	68
1.4.2. ARN de interferencia	69
2. MÉTODOS.....	71
2.1. Cultivos primarios, líneas celulares, medios y condiciones de cultivo.....	71
2.2. Clonajes, transfección de ADN y de ARN de interferencia	72
2.3. Obtención de extractos proteicos.....	72
2.4. Electroforesis de extractos proteicos (SDS-PAGE), transferencia e inmunodetección (Western blot).....	73
2.5. Ensayos de actividad de Rho-GTPasas por Pull-Down.....	73
2.6. Ensayos de inmunoprecipitación.....	74
2.7. Ensayos de biotinilación de proteínas de superficie celular.....	75
2.8. Ensayos de biotinilación dependiente de proximidad (BioID)	75
2.9. Inmunofluorescencia y microscopía confocal	76
2.10. Ensayos de marcaje de VE-cadherina en superficie celular.....	77
2.11. Videomicroscopía confocal	77

2.12. Microscopía de superresolución.....	77
2.13. Inmunohistoquímica.....	78
2.14. Ensayos de medición de resistencia transendotelial.....	78
2.15. Ensayo de depleción de calcio (<i>Calcium Switch</i>).....	79
2.16. Identificación de nuevas proteínas reguladas por TNF en células endoteliales...	79
2.17. <i>Screening</i> RT-PCR GTPasas y proteínas reguladas por TNF.....	80
2.18. Ensayos de infección por <i>Neisseria meningitidis</i>	81
2.19. Análisis estadístico	81
RESULTADOS	83
1. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA BARRERA ENDOTELIAL DURANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDEPENDIENTES DE LAS UNIONES INTERCELULARES	85
1.1. TNF aumenta la expresión de RhoB y Rnd1 en células endoteliales humanas.	85
1.2. RhoB se expresa preferentemente en vénulas post-capilares	86
1.3. RhoB se expresa en células microvasculares dermales y aumenta su expresión en respuesta a TNF.....	88
1.4. RhoB regula la recuperación de la función de barrera tras la contracción inducida por trombina en HDMVEC previamente estimuladas con TNF.	89
1.5. RhoB regula la re-extensión de protrusiones de membrana después de la estimulación con trombina en células endoteliales humanas.	90
1.6. RhoB y Rac1 co-localizan parcialmente en HDMVEC.....	93
1.7. RhoB co-localiza con marcadores endosomales tardíos	93
1.8. RhoB se localiza en estrecha proximidad con Rac1.....	95
1.9. La depleción de RhoB incrementa la actividad de Rac1.....	97
2. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA BARRERA ENDOTELIAL DURANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA DEPENDIENTES DE LAS UNIONES INTERCELULARES	99
2.1. La estimulación de HUVEC con TNF reduce la vida media de la VE-cadherina de superficie.....	99
2.2. La estimulación de HUVEC con TNF acelera la degradación de VE-cadherina de superficie por vía proteasoma.	102

2.3. La estimulación de HUVEC con TNF induce de forma transitoria la expresión de VE-cadherina.....	102
2.4. El aumento de la síntesis de VE-cadherina en respuesta a TNF está mediado por la vía NF- κ B.....	106
2.5. El factor de transcripción Ets1 se induce en respuesta a TNF por la vía NF- κ B y media la síntesis de VE-cadherina.....	108
2.6. La depleción transitoria de calcio induce la degradación de VE-cadherina en células endoteliales previamente estimuladas con TNF.....	111
2.7. Los niveles de VE-cadherina en la superficie celular se mantienen constantes a lo largo de una depleción transitoria de calcio.....	114
3. LA PROTEÍNA BST-2 SE INDUCE EN RESPUESTA A TNF Y REGULA LA DINÁMICA DE VE-CADHERINA.....	117
3.1. La estimulación de HUVEC con TNF modula la expresión y localización de proteínas en la superficie celular.....	117
3.2. El silenciamiento de BST-2 correlaciona con una bajada de los niveles de VE-cadherina.	119
3.3. La proteína BST-2 aumenta sus niveles totales en respuesta a TNF en HUVEC y HCMEC/D3.	120
3.4. Las proteínas BST-2 y VE-cadherina colocalizan parcialmente en HUVEC.....	120
3.5. Las proteínas BST-2 y VE-cadherina se localizan en distintos dominios vesiculares.	121
3.6. La reducción de los niveles de BST-2 mediante la expresión de la proteína Vpu correlaciona con una reducción de los niveles de superficie de VE-cadherina.....	122
3.7. Los dominios YxY, STS y anclaje GPI de BST-2 están implicados en el mantenimiento de los niveles de superficie de VE-cadherina en HUVEC.	123
3.8. BST-2 regula los niveles de Ets1.....	125
3.9. El silenciamiento de BST-2 retrasa la salida de VE-cadherina a la superficie celular tras un ensayo de depleción de calcio.	126
3.10. La depleción de BST-2 reduce la vida media de la población de VE-cadherina de superficie.	128
3.11. La depleción de BST-2 limita la recuperación de la función de barrera en HUVEC tras la supresión de la señalización por TNF.....	129

4. BST-2 SE INDUCE EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR <i>NEISSERIA MENINGITIDIS</i> EN DIFERENTES TIPOS CELULARES ENDOTELIALES Y CO-LOCALIZA CON LA POBLACIÓN DE VE-CADHERINA RELOCALIZADA BAJO LAS COLONIAS BACTERIANAS.	132
4.1. La infección de diferentes tipos celulares endoteliales con <i>Neisseria meningitidis</i> induce la expresión de BST-2.	132
4.2. BST-2 se relocaliza bajo las colonias de <i>Neisseria meningitidis</i>	133
DISCUSIÓN	135
1. RHOB REGULA NEGATIVAMENTE LA RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN DE BARRERA ENDOTELIAL TRAS LA CONTRACCIÓN AGUDA MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RAC1 EN CÉLULAS MICROVASCULARES.	137
2. DINÁMICA DE VE-CADHERINA.....	140
2.1. Disminución de la vida media de VE-cadherina en respuesta a TNF.....	140
2.2. Aumento de la síntesis de VE-cadherina en respuesta a TNF.....	141
2.3. Efecto de la aceleración de la tasa de reposición de VE-cadherina a nivel de las uniones intercelulares.....	142
3. BST-2 SE INDUCE EN RESPUESTA A TNF Y REGULA LOS NIVELES DE VE-CADHERINA EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS.	143
3.1. Efecto de BST-2 sobre la síntesis de VE-cadherina	143
3.2. Efecto de BST-2 sobre la integridad de VE-cadherina y la estabilización de los complejos de uniones adherentes.....	144
3.3. Infección por virus, regulación negativa de BST-2 y VE-cadherina.....	145
3.4. Asociación de BST-2 y Metaloproteinasas de matriz.....	145
3.5. BST-2 favorece la integridad vascular en vasos grandes	146
CONCLUSIONES	149
BIBLIOGRAFÍA	155
ANEXO (Manuscritos publicados durante la tesis)	183

ABREVIATURAS

- **AID**: del inglés *Activation Induced cytidine Deaminase*
- **AMPc**: Adenosín monofosfato cíclico
- **AP-1/2**: del inglés *Activator Protein 1/2*
- **ARN**: Ácido Ribonucleico
- **ARNm**: Ácido Ribonucleico Mensajero
- **Arp2/3**: del inglés *Actin-Related Proteins 2/3*
- **ATP**: Adenosín trifosfato
- **BSA**: del inglés *Bovine Serum Albumin*
- **BST-2**: del inglés *Bone Marrow Stromal T-cell antigen 2*
- **CBD**: del inglés *Cadherin Binding Domain*
- **Cdc42**: del inglés *Cell division cycle 42*
- **COX-2**: del inglés *Cyclooxygenase 2*
- **CREB**: del inglés *c-AMP Response Element Binding protein*
- **DAG**: Diacilglicerol
- **DEP-1**: del inglés *Density Enhanced Phosphatase-1*
- **DMEM**: del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- **EBM-2**: del inglés *Endothelial Basal Medium-2*
- **EC**: del inglés *Extracellular domain*
- **E-cadherina**: Cadherina Epitelial
- **ECIS**: del inglés *Electric Cell Substrate Impedance Sensing*
- **EDTA**: del inglés *Ethylenediaminetetraacetic Acid*
- **EGF**: del inglés *Epithelial Growth Factor*
- **EGFR**: del inglés *Epithelial Growth Factor Receptor*
- **EGM-2**: del inglés *Endothelial Growth Medium-2*
- **EHD1**: del inglés *EH Domain-containing protein 1*
- **EMMPRIN**: del inglés *Extracellular Matrix Metallo-Proteinase Inducer*
- **ERC**: del inglés *Endocytic Recycling Compartment*

- **ERK:** del inglés *Extracellular-signal regulated kinases*
- **ESCRT:** del inglés *Endosomal Sorting Complexes Required for Transport*
- **Ets1:** del inglés *E-26 transformation specific protein 1*
- **FA:** del inglés *Focal Adhesion*
- **F-actin:** actina filamentosa
- **FAK:** del inglés *Focal Adhesion Kinase*
- **FGF:** del inglés *Fibroblast Growth Factor*
- **FGFR:** del inglés *Fibroblast Growth Factor Receptor*
- **Fig.:** Figura
- **FIP2:** del inglés *Family Interacting Protein 2*
- **FITC:** del inglés *Fluorescein IsoTioCyanate*
- **FMNL3:** del inglés *Formin-like protein 3*
- **GAPs:** del inglés *GTPase-Activating Proteins*
- **GDIs:** del inglés *Guanosine nucleotide dissociation inhibitors*
- **GDP:** guanosín difosfato
- **GEFs:** del inglés *Guanine nucleotide Exchange Factors*
- **GFP:** del inglés *Green Fluorescent Protein*
- **GPI:** del inglés *GlycosylPhosphatidyInositol*
- **GST:** del inglés *Glutathione S-Transferase*
- **GTP:** guanosín trifosfato
- **GTPasa:** guanosín trifosfatasa
- **h:** hora
- **HBMEC:** del inglés *Human Brain Microvascular Endothelial Cells*
- **HDMVEC:** del inglés *Human Dermal MicroVascular Endothelial Cells*
- **HEPES:** ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil-(1)] etanosulfónico
- **HIF:** del inglés *Hypoxia Inducible Factor*
- **HRP:** del inglés *Horseradish peroxidase*

- **HUVEC**: del inglés *Human Umbilical Vein Endotelial Cells*
- **Hz**: hercio
- **ICAM-1**: del inglés *Intercellular Adhesion Molecule-1*
- **IF**: Inmunofluorescencia
- **IFN**: interferón
- **IFR1/2**: del inglés *Isoflavone Reductase 1/2*
- **IKK**: del inglés *I κ B kinase*
- **IL**: interleuquina
- **IP3**: del inglés *Inositol trisphosphate*
- **IPTG**: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
- **ISGF3**: del inglés *Interferon Regulatory Factor 3*
- **I κ B**: del inglés *Inhibitor of κ B*
- **JAM**: del inglés *Junctional Adhesion Molecule*
- **JMD**: del inglés *Juxtamembrane Domain*
- **JNK**: del inglés *c-Jun N-terminal Kinases*
- **kDa**: *kilo Dalton*
- **LARG**: del inglés *Leukemia-associated RhoGEF*
- **LBRC**: del inglés *Lateral Border Recycling Compartment*
- **LIMK1**: del inglés *LIM Domain Kinase 1*
- **LPS**: Lipopolisacárido
- **mDia**: del inglés *Diaphanous-related formin 1*
- **MICAL-L1**: del inglés *Microtubule Associated Monooxygenase, Calponin And LIM Domain Containing protein-like 1*
- **min**: minuto
- **MLC**: del inglés *myosin light chain*
- **MLCK**: del inglés *myosin light chain kinase*
- **MLCP**: del inglés *myosin light chain phosphatase*
- **NADPH**: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

- **N-cadherina:** Cadherina Neuronal
- **NF- κ B:** del inglés *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*
- **NOX:** del inglés *NADPH Oxidase*
- **OB-cadherina:** Cadherina osteoblástica
- **Ohms:** ohmios
- **Oligo/Primer:** abreviatura de “oligonucleótido”
- **p18/LAMTOR1:** del inglés *Late Endosomal/Lysosomal Adaptor, MAPK And MTOR Activator 1 (LAMTOR1)*
- **PAK:** del inglés *p21-activated kinase*
- **PAMP:** del inglés *Pathogen-Associated Molecular Pattern*
- **PAR:** del inglés *Protease-activated receptor*
- **PBS:** del inglés *Phosphate Buffer Saline*
- **PDZ:** del inglés *Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), and Zonula occludens-1 protein (ZO-1) domain*
- **PECAM:** del inglés *Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule*
- **Pil:** proteína de pili bacteriano
- **PMSF:** del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*
- **PRR:** del inglés *Pattern Recognition Receptor*
- **PVDF:** del inglés *Polyvinylidene fluoride*
- **Pyk2:** del inglés *Protein Tyrosine Kinase 2*
- **Rab:** del inglés *Ras related in brain*
- **Rac:** del inglés *Ras-related C3 botulinum toxin substrate*
- **Ras:** del inglés *Rat sarcoma*
- **Rho:** del inglés *Ras homolog*
- **RIF:** del inglés *Rho In Filopodia*
- **RIP:** del inglés *Receptor Interacting Protein*
- **Rnd:** del inglés *Round*
- **ROCK:** del inglés *Rho kinase*

- **ROS:** del inglés *reactive oxygen species*
- **Rtk:** del inglés *Rhotekin*
- **SDS:** del inglés *Sodium Dodecyl Sulfate*
- **SDS-PAGE:** del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*
- **SH2:** del inglés *Src Homology 2*
- **SHP2:** del inglés *Src Homology 2 Phosphatase*
- **siARN:** del inglés *small interfering RNA*
- **SP-1:** del inglés *Specificity Protein 1*
- **Src:** del inglés *Rous-Sarcoma non-receptor tyrosine kinase*
- **STAT-3:** del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription 3*
- **T:** trombina
- **TACE:** del inglés *Tumor Necrosis Factor Alpha Converting Enzyme*
- **TBS:** del inglés *Tris-buffered saline*
- **TEER:** del inglés *transendothelial electric resistance*
- **TF:** del inglés *Tissue Factor*
- **Tfp:** del inglés *Type IV pili*
- **TGF- β :** del inglés *Tumor Growth Factor β*
- **TGN:** del inglés *Trans Golgi Network*
- **TLR:** del inglés *Toll-Like Receptor*
- **TNF:** del inglés *Tumor Necrosis Factor alpha*
- **TNFR:** del inglés *Tumor Necrosis Factor Receptor*
- **TRADD:** del inglés *Tumor Necrosis Factor Receptor Associated Death Domain Protein*
- **TRAF:** del inglés *TNF Receptor Associated Factor*
- **TRITC:** tetrametilrodamina
- **TRPC:** del inglés *Transient Receptor Potential Cation Channel*
- **TSA:** del inglés *Tumor Specific Antigen*
- **TSAd:** del inglés, *T-cell specific adaptor*

- **Vav2:** del inglés *Vav Guanine Nucleotide Exchange Factor 2*
- **VCAM-1:** del inglés *vascular cell adhesion protein-1*
- **VE-cadherina:** *Cadherina Vascular Endotelial*
- **VEGF:** del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*
- **VE-PTP:** del inglés *Vascular Endothelial Protein Tyrosine Phosphatase*
- **VIH-1:** *Virus de la Inmunodeficiencia Humana 1*
- **Vpu:** del inglés *Viral Protein Unique*
- **WAVE:** del inglés *WASP family Verprolin-homologous protein*
- **WB:** del inglés *western blot*
- **XPLN:** del inglés *Exchange Factor Found In Platelets And Leukemic And Neuronal Tissues*
- **ZO:** *zonula occludens*
- **β 2-AR:** del inglés *β 2-Adrenergic Receptor*

RESUMEN

Resumen

El endotelio vascular constituye la capa más interna de los vasos sanguíneos y separa el torrente circulatorio del tejido subyacente. Durante la inflamación, la función de barrera del endotelio queda comprometida por la acción conjunta de mediadores inflamatorios y células del sistema inmune. Por otro lado, para que este aumento de permeabilidad no se torne deletéreo, existen mecanismos que restringen su alcance en el tiempo y en el espacio, lo cual permite el mantenimiento de la integridad endotelial. Sin embargo, estos fenómenos pueden alterarse, dando lugar a patologías de componente inflamatorio. En efecto, la disfunción endotelial es una de las principales causas de la aparición de enfermedades inflamatorias crónicas de gran prevalencia en nuestra sociedad.

En esta tesis hemos investigado los mecanismos dependientes e independientes de las uniones intercelulares que median la alteración de la permeabilidad endotelial en un contexto inflamatorio inducido por una exposición persistente a la citoquina inflamatoria TNF. Primero, hemos descubierto que la GTPasa RhoB se expresa en vasos pequeños en tejidos de pacientes con enfermedades inflamatorias, aquellos donde la función de barrera está más comprometida, y además aumenta sus niveles en respuesta a TNF en células endoteliales microvasculares. Hemos probado que RhoB juega un papel específico en el retraso de la recuperación de la función de barrera independientemente de las uniones adherentes en células endoteliales tanto microvasculares como vasculares. En efecto, dicha GTPasa inhibe la actividad y altera la localización de Rac1, limitándose así la formación de protrusiones de membrana. Por otro lado, TNF también altera la permeabilidad endotelial por mecanismos dependientes de las uniones adherentes. En este contexto, hemos demostrado en células de vasos grandes –HUVEC– que TNF incrementa la degradación de VE-cadherina a través del proteasoma. Sin embargo, esta degradación es compensada por un aumento de la síntesis de VE-cadherina por la vía NF- κ B, a través del factor de transcripción Ets1. Esto resulta en una aceleración de la tasa de reemplazamiento de VE-cadherina que correlaciona con un aumento de la permeabilidad endotelial, manteniéndose sin embargo constantes los niveles de superficie de dicha proteína, lo que preserva la integridad de este endotelio vascular. El mantenimiento de la expresión de VE-cadherina en células expuestas a TNF es mediado por BST-2, proteína que también se induce en respuesta a esta citoquina, la cual cicla entre un compartimento endosomal y la superficie celular y regula positivamente los niveles de Ets1, lo que sugiere que podría funcionar como un sensor de los niveles de VE-cadherina. De hecho, la expresión de BST-2 es necesaria para la recuperación de la función de barrera tras la terminación del estímulo inflamatorio inducido por TNF. Finalmente, en el contexto de la infección del endotelio con *Neisseria meningitidis*, BST-2 también incrementa su expresión y se relocaliza junto con VE-cadherina en la superficie endotelial en contacto con las colonias bacterianas, lo que sugiere una posible implicación en la reorganización de las uniones intercelulares provocada por esta infección.

Con todo, nuestros resultados indican que, por un lado, TNF incrementa la expresión de proteínas que debilitan la barrera endotelial, puesto que limitan la capacidad de reformación de ésta en un contexto inflamatorio. Por otro, TNF también induce un programa transcripcional compensatorio que preserva la integridad del endotelio en células

endoteliales de vasos grandes y contribuye a la recuperación de la homeostasis vascular durante la inflamación.

Abstract

The endothelium constitutes the inner line of the vessel wall and separates the bloodstream from the underlying tissue. During inflammation, endothelial barrier function is compromised by the joint action of both inflammatory mediators and cells of the immune system. On the other hand, for this permeability increase not to become deleterious, there are mechanisms that restrict its scope in space and time, thus permitting the maintenance of endothelial integrity. However, these phenomena can be altered, giving rise to pathologies related with inflammation. Indeed, endothelial dysfunction is one of the main causes of the prevalence of inflammatory diseases in our society.

In this thesis, we have investigated the mechanisms –both dependent and independent of adherens junctions- that mediate the alteration of endothelial permeability in an inflammatory context induced by a persistent exposition to the inflammatory cytokine TNF. First, we have found that RhoB GTPase is expressed in small vessels from patients with inflammatory diseases, those where barrier function is more compromised, and increases its levels in response to TNF in microvascular endothelial cells. We have also shown that RhoB plays a specific role in delaying barrier function recovery independently of adherens junctions in vascular and microvascular endothelial cells. Indeed, this GTPase inhibits the activity and localization of Rac1, thus limiting membrane protrusion formation. On the other hand, TNF also alters endothelial permeability by means of mechanisms that rely on adherens junctions. In this context, we have demonstrated in endothelial cells from big vessels –HUVEC-, that TNF increases VE-cadherin proteasomal degradation. However, this degradation is compensated by an increase of VE-cadherin synthesis via NF- κ B, in an Ets1 dependent manner. This results in an acceleration of VE-cadherin turnover, which correlates with an increase in endothelial permeability. However, surface VE-cadherin levels tend to remain constant, thus preserving endothelial integrity. This VE-cadherin maintenance is mediated by BST-2, a protein that is also induced in response to TNF and cycles between an endosomal compartment and the cell surface. BST-2 positively regulates Ets1 levels, which suggests that it could function as a VE-cadherin sensor. Indeed, BST-2 expression is necessary for barrier function recovery after the termination of the inflammatory stimulus induced by TNF. Finally, in the context of endothelial infection with *Neisseria meningitidis*, BST-2 also increases its expression and relocates with VE-cadherin at the cell surface, in contact with bacterial colonies. This suggests a possible implication of BST-2 in the reorganization of intercellular junctions caused by this bacterial infection.

To conclude, our results indicate that, on the one hand, TNF increases the expression of proteins that weaken the endothelial barrier by limiting its reformation capacity in an inflammatory context. On the other hand, TNF also induces a compensatory transcriptional program that preserves endothelial integrity in endothelial cells from big vessels and contributes to the recovery of vascular homeostasis during inflammation.

INTRODUCCIÓN

1. LA RESPUESTA INFLAMATORIA

Constituido por treinta billones de células y rodeado por treinta y nueve billones de bacterias (Sender et al., 2016), el ser humano ha tenido que lidiar a lo largo de su evolución con el daño físico, principal fuente de heridas e infecciones. Si los humanos hemos conseguido combatir de manera razonablemente eficaz dichas amenazas hasta el día de hoy, es gracias a la existencia de un sistema inmunitario (del latín, *immunitas*, que, en sentido histórico, significa “protección frente a la enfermedad”) en nuestro organismo (Abbas et al., 2008).

Una de las principales recursos empleados por el sistema inmunitario para luchar contra fenómenos perjudiciales es la inflamación (Okin y Medzhitov, 2012). Por su carácter conspicuo, ésta llamó probablemente la atención de los hombres primitivos hasta que el médico romano Cornelius Celsus dejó constancia por escrito en el siglo I después de Cristo de los cuatro signos cardinales de la inflamación: *rubor et tumor cum calore et dolore*, lo cual significa enrojecimiento e hinchazón con calor y dolor (Majno, 1975).

No fue hasta la segunda mitad del siglo XIX que, gracias a la mejora sustancial de las técnicas de microscopía, se pudo observar que los tejidos inflamados presentaban llamativas infiltraciones de leucocitos, así como una fuerte vasodilatación (Cohnheim, 1882). En base a ello, Rudolf Virchow postuló en 1858 un quinto punto cardinal de la inflamación, que denominó *functio laesa*. En efecto, dicho concepto establecía que la respuesta inflamatoria altera o perturba transitoriamente la función del tejido afectado para que éste pueda recuperar posteriormente sus condiciones homeostáticas iniciales.

Estos trabajos sirvieron de base al zoólogo ruso Élie Metchnikoff para ahondar en el estudio de la función de los leucocitos en el proceso inflamatorio. Así, en 1892, describió el proceso mediante el cual los leucocitos son capaces de “engullir” microorganismos, el cual denominó fagocitosis. Describió que ésta podía ser mediada por células de menor o mayor tamaño: micrófagos (hoy en día, leucocitos polimorfonucleares) y macrófagos respectivamente.

A lo largo del siglo XX y principios del XXI, se han realizado muchos avances en cuanto a la comprensión del funcionamiento, las causas y efectos del fenómeno inflamatorio (Medzhitov, 2010). Esta gran cantidad de conocimiento generado es de vital importancia para el tratamiento de enfermedades de componente inflamatorio que tanto prevalecen hoy en día en nuestra sociedad, como pueden ser la esclerosis múltiple o la artritis reumatoide.

1.1. Función de la respuesta inflamatoria en el organismo

La inflamación es una respuesta innata frente al daño tisular y la infección por microorganismos. El principal objetivo de la misma es la eliminación del agente causante del daño tisular así como la reparación del propio tejido (Abbas et al., 2008).

Más concretamente, cuando un tejido es invadido por un microorganismo, las células residentes del sistema inmune como por ejemplo, los mastocitos, macrófagos o leucocitos polimorfonucleares, reconocen patrones presentes en la superficie de las sustancias u organismos extraños denominados PAMP (Patrón Molecular Asociado a Patógenos). Este reconocimiento es operado por unos receptores presentes a su vez en las células del sistema inmune, los PRR (Receptores de Reconocimiento de Patrón). La interacción entre PAMP y PRR desencadena una cascada de señalización en las células del sistema inmune que culmina, entre otros efectos, con la activación de dichas células y la producción de mediadores proinflamatorios (Mahla et al., 2013). Por otro lado, en un contexto no-infeccioso, las células del sistema inmunitario también son capaces de patrullar el organismo, extravasarse y reconocer células que hayan sido dañadas o transformadas, produciéndose también la liberación de mediadores proinflamatorios (Lämmermann y Germain 2014; Reglero-Real et al., 2014; Reglero-Real et al., 2016).

La liberación de dichos mediadores tiene varios efectos sobre el sistema vascular y el tejido afectado. Por un lado, éstos son capaces de favorecer la vasodilatación -como en el caso de la histamina- aumentando en consecuencia el volumen de sangre que fluye hacia el tejido afectado (*Rubor*, enrojecimiento) (Romero et al., 2016). Por otro, también son capaces de favorecer el aumento de permeabilidad del endotelio vascular, produciéndose la infiltración de leucocitos y plasma sanguíneo en el tejido, como en el caso del TNF (*Tumor*, hinchazón) (Reglero-Real et al., 2012). Además, la producción de prostaglandinas y tromboxanos implica el aumento de la temperatura corporal (*calore*, fiebre) y la estimulación de las nociceptores (*dolore*, dolor) (Schaible et al., 2011).

En paralelo a la respuesta inflamatoria innata, puede darse también una respuesta inmune específica adquirida, la cual está mediada por anticuerpos. Ésta, muy eficaz a medio y largo plazo después de un contacto previo con el antígeno a combatir radica en la acción de los linfocitos B y T. Los primeros, diferenciados en la médula ósea (*Bone marrow*) son los encargados de producir y secretar los anticuerpos para mediar el reconocimiento específico de antígenos extracelulares. Los segundos, diferenciados en el Tímo, tienen como misión el reconocimiento de las células infectadas por microorganismos y su posterior destrucción (Abbas et al., 2008).

Una vez neutralizada la amenaza, el tejido debe volver a las condiciones homeostáticas previas para recuperar su funcionalidad. Para ello, se activan los mecanismos de resolución para finalizar la respuesta inflamatoria, los cuales implican la síntesis de resolvinas y protectinas que fomentan la apoptosis de los neutrófilos y su fagocitosis por parte los macrófagos que además tenderán a salir del tejido inflamado drenándose hacia el vaso linfático más cercano (Serhan y Savill, 2005). Además, entran en juego mecanismos de reparación que tienen como objetivo la restauración de la arquitectura del tejido dañado. Éstos comprenden desde la coagulación (factor de activación plaquetaria y trombina) hasta la proliferación de células epiteliales, endoteliales y fibroblastos (Reinke y Sorg, 2012).

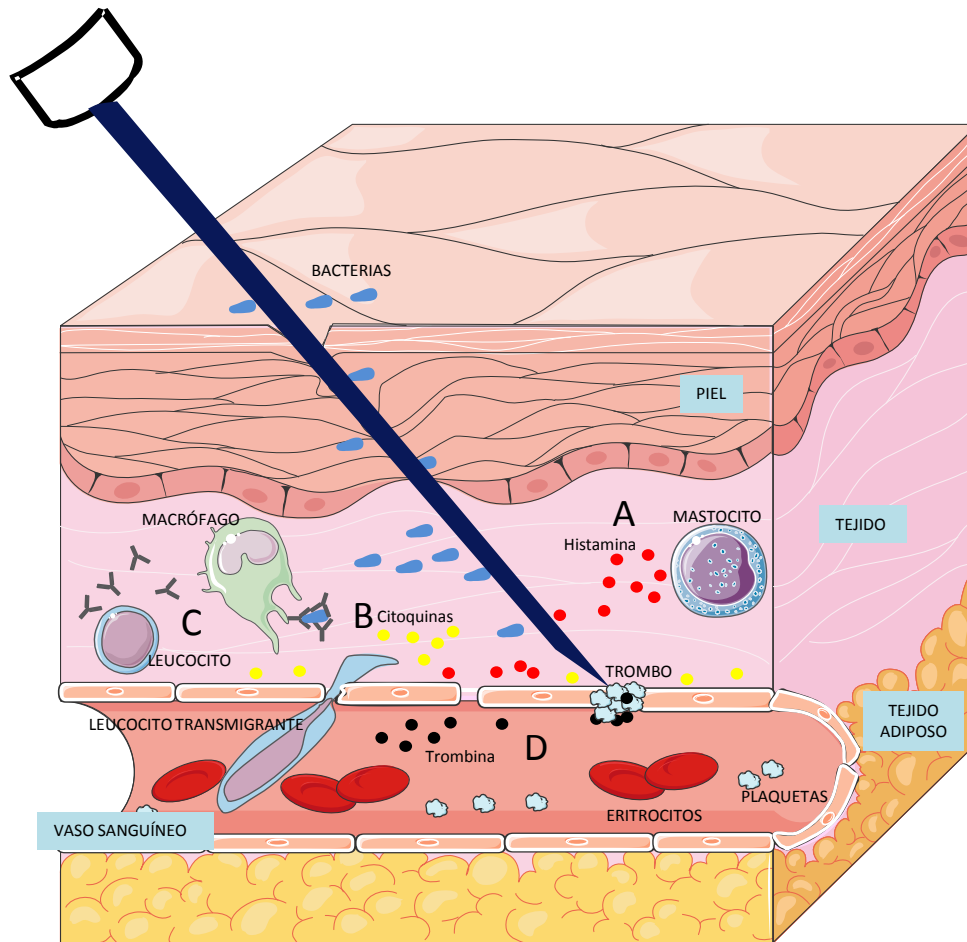


Ilustración 1. La respuesta inflamatoria humana. Cuando un tejido es sujeto a daño o infección, las propias células afectadas son capaces de activar las células del sistema inmune residentes, como por ejemplo los mastocitos o los macrófagos. En un primer momento, los mastocitos liberan histamina y otros mediadores de la inflamación que activarán y reclutarán células del sistema inmune circulantes. Además, dichos mediadores también inducirán vasodilatación y un aumento de la permeabilidad endotelial en los vasos que circundan la región tisular afectada (A). Tras esta respuesta rápida y temprana, los macrófagos liberan una plétora de citoquinas pro-inflamatorias que permiten sostener la respuesta inflamatoria en el tiempo. Dicho fenómeno radica en la acción de estas citoquinas sobre el endotelio vascular, provocando cambios morfológicos y de expresión proteica que a su vez inducen un aumento de la permeabilidad endotelial y de la trans migración linfocitaria (B). Una vez extravasados, los linfocitos activados emplean diferentes estrategias moleculares para combatir los agentes infecciosos, así como las células dañadas o infectadas (C). Por ende, la liberación de trombina –agente coagulador– favorece la agregación plaquetaria y la formación de coágulos que permitirán taponar la herida formada, a la par que favorece también el aumento de la permeabilidad endotelial (D).

1.2. El componente inflamatorio en las enfermedades humanas

La respuesta inflamatoria puede resultar muy beneficiosa para proteger el organismo si se ejecuta de manera restringida en tiempo y espacio. Sin embargo, dicha respuesta puede resultar deletérea si se da de manera exacerbada o incluso sostenida en el tiempo. Esto puede suceder cuando un antígeno no se ha eliminado completamente o cuando se generan auto-anticuerpos que reaccionan contra el propio organismo. En estos últimos casos, la inflamación se puede volver crónica. Desde un punto de vista evolutivo, parece que los organismos dotados de sistema inmunitario consiguen mantener a raya infecciones y otras

amenazas en edad temprana, al precio de desarrollar enfermedades inflamatorias crónicas a edad más avanzada (Okin y Medzhitov, 2012).

Así, en la actualidad, muchas enfermedades humanas tienen su origen en el establecimiento de una respuesta inflamatoria crónica. Por ejemplo, la esclerosis múltiple es una enfermedad inflamatoria neurodegenerativa del sistema nervioso central que radica en la desmielinización neuronal (Marcos-Ramiro et al., 2014). Aunque la etiología de la esclerosis múltiple no está del todo esclarecida, se conoce que la vasculatura desempeña una función clave en el desarrollo de la enfermedad (Bennett et al., 2010). En efecto, la alteración de la barrera endotelial conlleva una mayor infiltración leucocitaria, lo cual provoca un incremento de los fenómenos inflamatorio y desmielinizante (Kirk et al., 2003).

La enfermedad de Crohn es otra enfermedad inflamatoria crónica que afecta el tracto gastrointestinal. Aunque sus causas no están del todo dilucidadas, parece que radica en una interacción anormal entre la microbiota comensal y el sistema inmune del hospedador. En efecto, la enfermedad se caracteriza por la alteración del balance entre los linfocitos T reguladores y efectores, inclinándose la balanza en favor de estos últimos (Weaver y Hatton, 2009). Así, la infiltración leucocitaria se incrementa, favoreciendo y perpetuando la inflamación (Baumgart y Sandborn, 2012).

Por otro lado, una respuesta inflamatoria exagerada –aunque no necesariamente crónica– también puede ser muy deletérea. Es el caso de la sepsis, definida como una “respuesta inflamatoria sistémica a una infección” (Singer et al., 2016). Durante el transcurso de ésta, además de una fuerte disfunción endotelial, se origina una intensa actividad procoagulante que limita el flujo sanguíneo a órganos de vital importancia a través de la formación de pequeños coágulos (Angus y van der Poll, 2013).

También, podría existir una relación entre inflamación crónica y cáncer. Más concretamente, se ha postulado que el microambiente inflamatorio puede incrementar las tasas de mutación mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, compuestos intermedios reactivos de nitrógeno o la inducción de AID (“*activation-induced cytidine deaminase*”). Así, se favorecería la generación de alteraciones en el DNA que podrían inducir carcinogénesis (Mechtcheriakova et al., 2012).

Por todo ello, el estudio de la inflamación no sólo tiene interés desde el punto de vista de la ciencia básica, si no que también resulta de vital importancia en el campo de las ciencias biomédicas.

1.3. Papel dinámico del endotelio vascular

El endotelio vascular constituye la capa más interna de los vasos sanguíneos, la cual está en contacto con el torrente sanguíneo en su dominio apical. Está formado por una monocapa de células endoteliales. Éstas son muy planas y poseen unas uniones adherentes y estrechas altamente complejas y especializadas (Dejana, 2004).

A partir de la década de 1970, se comenzó a generar un cuerpo de conocimiento que permitió demostrar que, contrariamente a lo que se creía, el endotelio no es una mera frontera inerte entre la sangre y los tejidos, si no que constituye una barrera semipermeable

activa, dinámica y capaz de señalizar y expresar diferencialmente proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria. (Dejana et al., 1997; Reglero-Real et al., 2012).

Así, en condiciones no inflamatorias (basales), el endotelio vascular cumple con funciones homeostáticas esenciales como son garantizar la fluidez de la sangre, regular el flujo sanguíneo, controlar el calibre de los vasos, así como mantener un nivel de permeabilidad limitado (Coughlin, 1999; Busse y Fleming, 2006; Arnout et al., 2006). Sin embargo, en respuesta a estímulos proinflamatorios como el LPS, la IL- β o el TNF, el endotelio vascular adopta un fenotipo diferente: éste se vuelve más permeable (Beynon et al., 1993), las células que lo componen adoptan una morfología más alargada (Emmanuel et al., 2013), expresan una serie de proteínas de superficie que favorecen la trans migración leucocitaria (Reglero-Real et al., 2012) y sus uniones intercelulares se vuelven más dinámicas (Millán et al., 2010).

1.4. El TNF y su señalización en el endotelio vascular

El Factor de Necrosis Tumoral (TNF) fue descrito en 1975 como un factor circulante capaz de causar necrosis en tumores (Carswell et al., 1975). Sin embargo, hoy en día, éste ha sido identificado como un regulador clave de la respuesta inflamatoria (Bradley, 2008). Aunque no se suele detectar en individuos sanos, el TNF sí puede aparecer en niveles elevados tanto en el suero como en los tejidos en condiciones inflamatorias e infecciosas (Robak et al., 1998).

Dicha citoquina es producida preferentemente por macrófagos y linfocitos T activados como un pro-péptido de 26 kDa denominado pro-TNF, el cual es expresado a nivel de la membrana plasmática. Allí, el pro-TNF puede ser cortado por metaloproteinasas de matriz como TACE, también conocida como ADAM-17, teniendo como resultado la liberación de una proteína soluble de 17 KDa, el TNF (Black et al., 1997). Aunque la principal fuente de TNF suelen ser los macrófagos y monocitos, éste también puede ser sintetizado por mastocitos, linfocitos B y T, células NK, neutrófilos, fibroblastos e incluso células endoteliales.

Una de las principales dianas de acción del TNF es el endotelio vascular (Pober y Cotran, 1990). Un amplio abanico de efectos resulta de la interacción del TNF y las células endoteliales: se dan cambios rápidos de morfología y motilidad independientes de la síntesis *de novo*, así como la expresión de nuevas proteínas capaces de regular otros parámetros de la respuesta inflamatoria como, por ejemplo, la vasoregulación (COX-2), la adhesión y activación leucocitaria (ICAM-1, E-Selectina) o incluso la coagulación (Factor tisular) (Madge y Pober, 2001). También puede reprimirse la síntesis de otras proteínas como la trombomodulina o eNOS.

Hasta la fecha, se han caracterizado dos receptores de TNF, TNFR-1 (55 KDa) y TNFR-2 (75 KDa). TNFR-1 se expresa de manera ubicua mientras que TNFR-2 se expresa únicamente en células del sistema inmune y el endotelio vascular (Cabal-Hierro y Lazo 2012). A nivel celular, TNFR-1 se localiza predominantemente en el aparato de Golgi y apenas en la superficie, a diferencia de TNFR-2, el cual se sitúa mayoritariamente a nivel de la membrana plasmática (Bradley et al., 1995). Esta localización diferencial podría deberse a que TNFR-2 responde principalmente a TNF expresado en otras células como proteína

integral de membrana (Grell et al., 1995) mientras que TNFR-1 responde a TNF soluble, el cual puede ser endocitado (Black et al., 1997). Ambos receptores carecen de actividad catalítica intrínseca y, por tanto, requieren del ensamblaje de complejos supramoleculares de proteínas citosólicas para transducir señales.

El amplio repertorio de respuestas de señalización inducidas por el TNF deriva, por tanto, de la capacidad de los receptores para reclutar a su vez numerosas proteínas adaptadoras. La asociación entre todas estas macromoléculas define una serie de dominios que son capaces de participar en diferentes cascadas de señalización.

Una de las principales vías inducidas por TNF es la mediada por NF- κ B. En esencia, la unión de trímeros de TNF a los receptores TNFR permite el ensamblaje de los complejos TRADD-RIP-TRAF2 (Madge y Pober, 2001) que reclutan y activan las proteínas IKK (Quinasas inhibidoras de I κ B). Estas proteínas IKK son capaces de fosforilar I κ B, favoreciendo su ubiquitinación y posterior degradación. La ausencia de I κ B conlleva la exposición de la secuencia de translocación nuclear de la subunidad p65 del factor de transcripción NF- κ B, el cual entra en el núcleo y regula la transcripción de una plétora de genes asociados con la respuesta inflamatoria a largo plazo (Marcos-Ramiro et al., 2014).

Por otro lado, los complejos de señalización asociados a los receptores TNFR también pueden activar la vía de JNK, la cual culmina con la translocación nuclear de AP-1, factor de transcripción que induce otro abanico de genes (Brenner et al., 1989), o incluso apoptosis (mediante la activación de la Caspasa 8) y necrosis a través del ensamblaje de un complejo multiproteico denominado necrosoma (Vandenabeele et al., 2010).

Además de inducir la síntesis de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria (principalmente citoquinas y moléculas de adhesión), el TNF también señala al citoesqueleto de actina y los complejos de uniones intercelulares (Marcos-Ramiro et al., 2014).

1.5. El TNF y el aumento de permeabilidad endotelial

Además de la estimulación de las vías canónicas anteriormente descritas, las cuales conllevan cambios en la expresión génica, el TNF también es capaz de señalar al citoesqueleto de actina mediante la activación de Rho GTPasas. Hasta la fecha, se ha establecido que TNF activa RhoA, Rac y Cdc42, los tres miembros mejor caracterizados de los veintidós que componen la familia Rho (Wennerberg y Der, 2004; Ridley, 2006). La conexión molecular entre la unión del TNF a sus receptores y la activación de las Rho GTPasas todavía no se conoce bien. Aunque se han descrito varias proteínas GEF que se activan en respuesta a la interacción TNF/TNFR, las interacciones moleculares entre los miembros de la familia Rho siguen siendo exploradas.

Así, uno de los principales efectos de TNF en las células endoteliales es la inducción de su remodelado morfológico a través de la reorganización del citoesqueleto de actina, lo cual ha sido observado *in vivo* (Hocking et al., 1990) e *in vitro* (Wójciak-Stothard et al., 1998; Stolpen et al., 1986; Deli et al., 1995). En respuesta a esta citoquina, el endotelio pasa de tener un aspecto de tipo “empedrado”, con un cinturón periférico de actina asociado a

uniones intercelulares estables, a una morfología más estirada y alargada, fruto del enriquecimiento en fibras de estrés. Esta formación de fibras de estrés es el resultado de la señalización del eje RhoA-ROCK (Rho Kinase). ROCK es capaz de fosforilar e inhibir la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLC), lo cual induce la fosforilación de MLC y ensamblaje de filamentos de actina con una alta contractilidad (Chrzanowska-Wodnicka y Burridge, 1996). Como la contracción mediada por la actina y la miosina es un mecanismo muy relevante en la disrupción de barrera endotelial, se hipotetizó en su momento que esta vía de señalización era clave en reorganización del endotelio mediada por TNF y la alteración de la función de barrera a largo plazo. Sin embargo, existen evidencias experimentales (McKenzie y Ridley 2007; Fernández-Martín et al. 2012; Schlegel y Waschke 2009; Mong y Wang, 2009; Petrache et al., 2001) que demuestran que la vía RhoA-ROCK es importante es el remodelado morfológico, pero no necesaria para la pérdida de función de barrera a largo plazo. Estos resultados sugieren la existencia de otros mecanismos implicados en el aumento de permeabilidad del endotelio vascular en respuesta a TNF. Principalmente, éstos consisten en el debilitamiento de las uniones intercelulares dependientes de VE-cadherina, los cuales serán introducidos en el apartado correspondiente al efecto de TNF sobre la dinámica de uniones interendoteliales (3.3).

1.6. Mediadores que comprometen la integridad endotelial en un ambiente inflamatorio

En un ambiente pro-inflamatorio, el endotelio se encuentra expuesto a otros mediadores solubles cuya acción sobre el endotelio puede ser más restringida en el tiempo, incluso comprometiendo irreversiblemente su integridad. Dichos factores son capaces de inducir un aumento de permeabilidad transitorio que se resuelve de manera rápida (1-2 h), recuperándose unos niveles de permeabilidad similares a los que precedían el estímulo. Esto sucede, por ejemplo, tras la estimulación del endotelio con trombina (Marcos-Ramiro et al., 2016).

La acción prolongada de las citoquinas y linfocitos activados sobre el endotelio puede acabar provocando daño vascular. En este contexto inflamatorio que se torna lesivo, o incluso en respuesta a una herida o daño causado por un agente externo, la cascada de coagulación se activa con el fin de reparar las áreas afectadas (Levi et al., 2012). En esencia, el factor de tejido (TF), que es una proteína transmembrana producida por células epiteliales, macrófagos y otros tipos celulares que en condiciones normales no están en contacto con el torrente circulatorio, entra en contacto con la sangre tras la ruptura de un vaso. Allí, se encuentra con factores circulantes e induce su transformación mediante una serie de reacciones zimógenas, como en el caso de la conversión de protrombina en trombina. La trombina, que es una serina proteasa, corta proteolíticamente el fibrinógeno, generándose fibrina, la cual favorece la agregación plaquetaria y la formación de trombos que podrán taponar las zonas afectadas por el daño vascular (Johari y Loke, 2012). Además, la trombina actúa como quimioatrayente de linfocitos y como agente mitogénico en linfocitos, fibroblastos y células del músculo liso, lo cual permite la reparación de las zonas afectadas.

Por otro lado, la trombina también tiene un efecto directo sobre el endotelio vascular. Éste es ejercido a través de los receptores PAR (del inglés, protease-activated receptor), que son receptores acoplados a proteínas G que se activan tras un corte proteolítico de su dominio extracelular. Las células endoteliales expresan los receptores PAR-1, PAR-2, PAR-3 y PAR-4, siendo el primero el más expresado y el mayor responsable de los efectos de la trombina sobre el endotelio (Martorell et al., 2008). Dichos efectos se inician cuando la proteasa corta el receptor PAR-1 en su dominio extracelular, exponiendo un nuevo dominio amino-terminal, el cual actúa como ligando del receptor, permitiendo la auto-activación de este último (Coughlin, 2000). A su vez, la asociación de PAR1 a distintas proteínas de la familia G activa un amplio abanico de cascadas de señalización (Vogel et al., 2000). Una de ellas, a través de la activación de proteínas activadoras de Rho GTPasas (Rho GEFs) vía G α 12/13 (Vouret-Craviari et al., 1998), provoca contracción endotelial aguda y conlleva la aparición de hiperpermeabilidad transitoria y edemas. Otra cascada permite la activación de la vía de JNK (Stähli et al., 2006), favoreciendo la producción de proteínas implicadas en la respuesta inflamatoria y procoagulante, como el factor de tejido, el factor activador de plaquetas (Zimmerman et al., 1996) y las interleucinas 6 y 8 (Johnson et al., 1998).

Existe una relación bidireccional entre los fenómenos de inflamación y coagulación, de tal modo que ambos procesos son capaces de regularse de manera recíproca (Popović et al., 2012), aunque la coagulación no puede producirse si no es en un ambiente inflamatorio (Petäjä, 2011). En particular, la trombina es capaz de actuar de manera sinérgica con el TNF, potenciando sus efectos. En efecto, se ha descrito que la trombina modula la expresión de proteínas que pueden ser inducidas por TNF (Cernuda-Morollón y Ridley, 2006). Induce la síntesis de receptores de expresión, IL-6 e IL-8 en células endoteliales, IL-8 en monocitos y macrófagos así como su propia síntesis en plaquetas (Petäjä, 2011). Se ha mostrado asimismo que el TNF potencia los efectos de la trombina en el endotelio, produciéndose un significativo retraso en la monocapa tras la contracción endotelial inducida por trombina (Paria et al., 2004).

2. LA FAMILIA DE LAS RHO GTPASAS

Como se ha visto anteriormente, la inflamación es un fenómeno que radica en la liberación de citoquinas capaces de estimular el endotelio vascular, entre otros tipos celulares. Los cambios fenotípicos que se operan en el endotelio, así como los cambios en los niveles de permeabilidad, derivan en muchos casos de la reorganización del citoesqueleto de actina, fenómeno que depende en gran medida de la acción de proteínas de la familia de las Rho GTPasas.

2.1. Miembros de la familia de las Rho GTPasas, activación, inactivación, localización.

El primer ensayo en el que se caracterizó la familia de las Rho GTPasas —se aislaron a partir del ganglio abdominal de un gasterópodo marino del género *Aphysia*— fue realizado en 1985 por Madaule y Axel (Madaule y Axel, 1985). Desde entonces, han florecido multitud de estudios que implican a esta familia de proteínas en procesos como la motilidad celular,

la reorganización de las uniones intercelulares o el ciclo celular (Hall, 1998; Ridley et al., 1995; Citi et al., 2014).

Las Rho GTPasas pertenecen a la superfamilia Ras y tienen un peso molecular bajo, el cual ronda los 21 kDa. La familia de las Rho GTPasas consta de 23 miembros agrupados en 8 clases en base a su secuencia aminoacídica (Rho, Rac, Cdc42, Rnd, RIF, RhoBTB, RhoU/V y RhoH (Heasman y Ridley, 2008). Por su temprano descubrimiento, las Rho GTPasas más estudiadas son RhoA (Madaule y Axel, 1985), Rac (Didsbury et al., 1989) y Cdc42 (Munemitsu et al., 1990).

La mayoría de las Rho GTPasas ciclan entre un estado activo e inactivo. Éstas se encuentran activas cuando están unidas a GTP e inactivas cuando están unidas a GDP (Etienne-Manneville y Hall, 2002). Existen efectores que regulan la transición entre ambos estados. Por un lado, las proteínas GAP (del inglés, *GTPase activating protein*) catalizan la hidrólisis del GTP a GDP, inactivando la Rho GTPasa. Por otro, las proteínas GEF (del inglés, *Guanosine Exchange Factor*) median el intercambio de GDP por GTP, lo cual activa la Rho GTPasa. Además, un tercer tipo de efector llamado GDI (del inglés, *Guanosine dissociation inhibitor*) retiene el GDP unido a la GTPasa, impidiendo su intercambio por GTP y, por ende, inactivando la GTPasa (Narumiya, 1996; Bourne et al., 1991).

Las Rho GTPasas pueden sufrir modificaciones post-traduccionales en su dominio C-terminal. En efecto, éstas pueden ser preniladas mediante la adición de un grupo farnesil (15 carbonos), geranilgeranil (20 carbonos) o palmitoil (16 carbonos) (Wennerberg y Der, 2004). Estas modificaciones permiten el anclaje de la GTPasa a membranas, desde donde podrán interactuar con sus proteínas efectoras. Teniendo en cuenta el número de Rho GTPasas y efectores (GEF, GAP y GDI) presentes en la célula, la combinatoria y la localización subcelular de estas proteínas teje una red de señalización compleja que permite regular finamente su actividad.

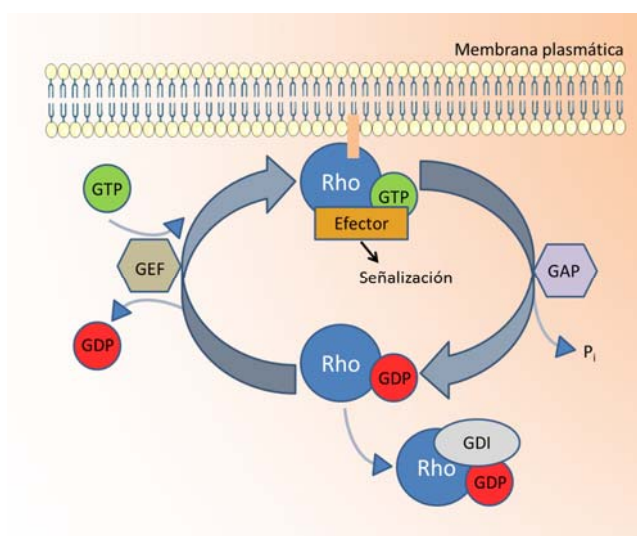


Ilustración 2. Esquema recapitulativo del ciclo de activación e inactivación de Rho GTPasas.

Las GTPasas de la familia Rho son consideradas como interruptores moleculares que ciclan entre un estado inactivo —marcado por la unión a GDP— y un estado activo —marcado por la unión a GTP—. La activación es mediada por Factores de Intercambio de Guanosina (GEF) capaces de intercambiar GDP por GTP. Al activarse, las Rho GTPasas sufren un cambio conformacional que les permite interactuar con sus efectores, activándolos. Una vez desencadenada la correspondiente cascada de señalización, los factores activadores de GTPasas (GAP) hidrolizan el GTP a GDP. Así, la GTPasa queda nuevamente en estado inactivo y la señalización es inhibida. Existe un tercer tipo de factor regulador, los Inhibidores de Disociación de GDP (GDI). Éstos interactúan con las formas inactivas y las mantienen en dicho estado en el citoplasma.

2.2. La subfamilia RhoA: Expresión, modificaciones post-traduccionales y localización, reguladores, efectores y funciones

En vertebrados superiores, la subfamilia RhoA está formada por tres miembros, RhoA, RhoB y RhoC. En un primer momento, debido a su alta identidad en términos de secuencia aminoacídica (85 %) y a que su sobreexpresión individual induce la formación de fibras de estrés, se pensó que debían tener funciones redundantes en la célula. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que RhoA, RhoB y RhoC participan en diferentes procesos celulares (Vega et al., 2011; Malissein et al., 2013; Ridley, 2013).

Las tres proteínas se expresan en todos los tejidos (Human Protein Atlas, <http://www.proteinatlas.org/>). Los niveles de RhoB son aquellos que varían en mayor medida, sobre todo en respuesta a diferentes estímulos (Wheeler y Ridley, 2004). Más concretamente, RhoB se induce en respuesta a luz ultravioleta (Fritz et al., 1999), a EGF (de Cremoux et al., 1994) y TGF- β (Vasilaki et al., 2010) hace que aumenten sus niveles mediante la inhibición de su degradación vía proteasoma.

RhoA y RhoC han sido caracterizadas como proteínas pro-oncogénicas. RhoA favorece la citocinesis y la migración (Vega y Ridley, 2008) y RhoC está implicada en metástasis (Karlsson et al., 2009). Por contra, RhoB es considerada como supresor de tumores por cuanto su expresión disminuye en diferentes tumores humanos (Huang y Prendergast, 2006).

RhoA, RhoB y RhoC son preniladas en un residuo cisteína C-terminal, el cual sufre una metilación y eliminación proteolítica de los 3 últimos residuos aminoacídicos (Shao y Dixon, 2003). RhoB puede sufrir la adición de un grupo farnesil, geranilgeranil o palmitoil, lo cual implica que pueda localizarse tanto en endosomas como en el citosol y la membrana plasmática. Sin embargo, RhoA y RhoC sólo pueden ser geranilgeraniladas, lo que permite su localización en el citosol o la membrana plasmática, pero no en endosomas (Adamson et al., 1992; Sandilands et al., 2004).

Los efectores mejor caracterizados de la subfamilia RhoA son ROCKI/II, proteína que presenta una mayor afinidad por RhoC que por los otros dos miembros (Wheeler y Ridley, 2004) y que está implicada en la formación de fibras de estrés y la contracción mediada por actomiosina y las forminas de tipo mDia, como mDia1, la cual favorece la polimerización de actina y es reclutada por los tres miembros de la subfamilia RhoA (Watanabe et al., 1999). Además, estos dos efectores también regulan fenómenos dependientes de microtúbulos como son el tráfico y la polaridad celulares (Takesono et al., 2010), la citocinesis (Kaibuchi, et al., 1999), así como el desarrollo en general (Wei et al., 2002).

Algunos estudios han tratado de definir las funciones específicas de cada uno de los tres miembros de la subfamilia RhoA, habiéndose demostrado que RhoA induce un incremento en el reciclaje de las adhesiones focales en el frente de avance de células en migración (Ridley, 2000), que RhoB regula negativamente la migración de células tumorales bronquiales humanas mediante Akt y Rac (Bousquet et al., 2009) y que RhoC limita la extensión de los lamelipodios a través de la formina FMNL3 (Vega et al., 2011).

2.3. Las Rho GTPasas son reguladores esenciales del citoesqueleto de actina en inflamación

Como ya se ha comentado, las GTPasas de la subfamilia RhoA son capaces de regular el citoesqueleto de actina gracias a sus efectores ROCK y mDia. Más concretamente, está bien establecido que RhoA activa, por un lado, la formina mDia produciéndose así la nucleación y polimerización de filamentos de actina (Watanabe et al., 1997) y por otro, la quinasa ROCK, la cual provoca la fosforilación de la cadena ligera de la miosina II de dos maneras diferentes: por fosforilación directa, o mediante la fosforilación de la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina MLCP (Amano et al., 1996; Kimura et al., 1996). Así, la miosina se activa, se une a filamentos de actina y promueve la formación de gruesos haces de actina denominados fibras de estrés. Además, la miosina II es capaz de contraer las fibras de estrés al hacer que distintos haces de actina se deslicen los unos sobre los otros. Además, ROCK inhibe la cofilina (Lappalainen y Drubin, 1997), proteína cuya función es despolimerizar actina, estabilizándose en consecuencia los haces de actina. Al mismo tiempo, ROCK activa la quinasa LIMK1 (Maekawa et al., 1999), que a su vez inhibe también la cofilina (Yang et al., 1998).

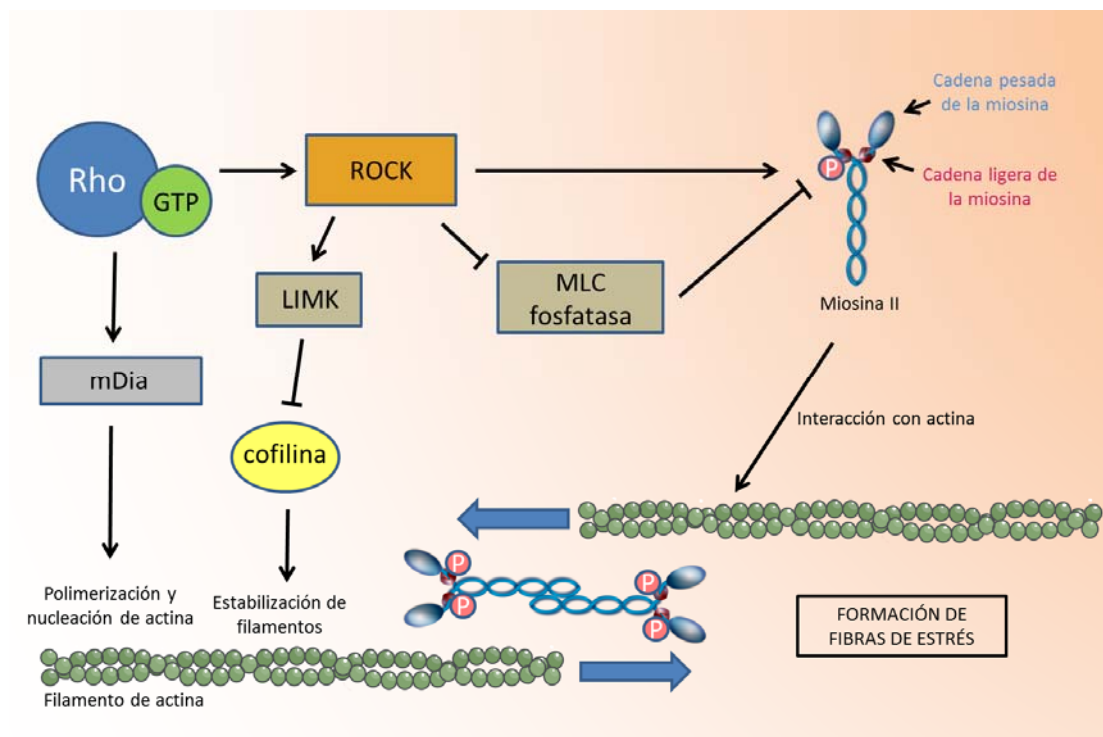


Ilustración 3. Representación esquemática de la cascada de señalización intracelular de la vía Rho-ROCK, responsable de la formación de fibras de estrés. Las proteínas de la subfamilia RhoA activas median la formación de fibras de estrés de dos maneras. Por un lado, mediante la activación de mDia, efector capaz de inducir la polimerización y nucleación de actina. Por otro, mediante la activación de la quinasa ROCK, la cual, a su vez, favorece la formación de fibras de estrés de manera triple: induce la fosforilación directa de la Cadena Ligera de la Miosina (MLC), estabiliza dicha fosforilación mediante la inhibición de la fosfatasa MLC y además fosforila LIMK, la cual fosforila e inactiva a cofilina.

2.4. Rac y la formación del frente de avance

Las Rho GTPasas Rac están implicadas en la formación de protrusiones membranasas como lamelipodios y *ruffles* (ondulaciones dorsales), sobre todo en contexto migratorio (Nobes y Hall, 1995). Por tanto, ejercen su acción sobre el citoesqueleto de actina que está asociado a la membrana plasmática. Es precisamente en esa región de la célula donde se sitúan las GEF de Rac, así como sus múltiples efectores, los cuales actuarán en respuesta a su activación. En este sentido, la polimerización de actina en respuesta a la activación de Rac es mediada por el complejo proteico WAVE (del inglés, *WASP family Verprolin-homologous protein*), que a su vez activa el complejo Arp2/3 (del inglés, *actin related proteins 2/3*) y reclutándose cortactina (Le Clainche y Carlier, 2008), formándose así una red de filamentos de actina ramificados. Además, Rac, a través de su efector PAK activa a LIMK, inhibiéndose así la cofilina, lo cual permite la estabilización de los filamentos de actina generados.

2.5. Las Rho GTPasas son reguladores del tráfico vesicular

Se ha mostrado que varias Rho GTPasas se sitúan en compartimentos endosomales, lo cual sugiere que pueden jugar un papel en el tráfico intracelular. En una primera aproximación, Ridley y colaboradores demostraron que la activación de Rac1 favorecía la internalización de fluido extracelular por macropinocitosis (Ridley et al., 1992). Desde entonces, numerosos estudios han puesto de manifiesto la implicación de miembros de la familia de las Rho GTPasas en la remodelación del citoesqueleto de actina y la composición de los fosfoinosítidos de membrana, los cuales reclutan maquinaria de endocitosis a la membrana plasmática, principalmente quinasas y fosfatasas (Di Paolo y De Camilli, 2006; Weernink et al., 2004; Fritsch et al., 2013). Cabe señalar la asociación de Rac1 con AP1, adaptador que regula el tráfico entre la red trans-Golgi y los endosomas y la de RhoB con mDia, Src y EGFR en vesículas intracelulares (Fernandez-Borja et al., 2005; Sandilands et al., 2004; Gampelet et al., 1999).

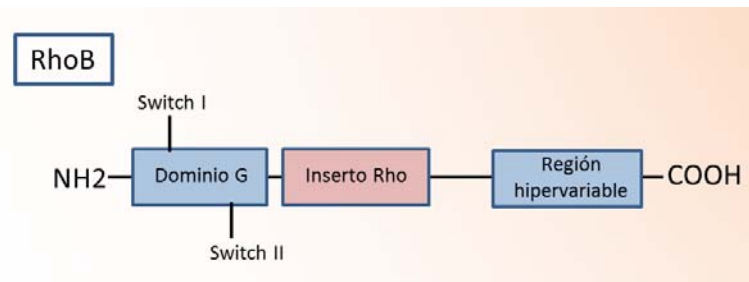


Ilustración 4. Estructura esquemática de RhoB. La proteína RhoB consta de tres dominios principales. Por un lado, un dominio G N-terminal responsable de la unión a nucleótidos de guanosina, en el cual dos regiones “bisagra” (Switch I y II) permiten que se dé el cambio conformacional que media la activación de la GTPasa. Por otro, un “dominio de inserto” implicado en la interacción con proteínas efectoras. Por último, posee una región C-terminal hipervariable donde también se pueden dar interacciones con proteínas reguladoras y efectoras y cerca de la cual se operan las modificaciones post-traduccionales como la prenilación.

3. LAS UNIONES INTERCELULARES EN EL ENDOTELIO VASCULAR

Como ya se ha comentado, el endotelio vascular está constituido por una capa de células endoteliales que tapiza la totalidad del sistema circulatorio. El endotelio ejerce una función de barrera semipermeable entre el torrente circulatorio y el tejido subyacente. En este sentido, existe un sistema de control de la permeabilidad endotelial que radica, entre otros mecanismos, en la regulación de la cohesión celular a través de sus uniones intercelulares (Dejana, 2004).

3.1. Origen de las proteínas de uniones intercelulares. Transición de organismos unicelulares a organismos complejos. Tipos de cadherinas.

La evolución de los animales -metazoos- desde sus ancestros unicelulares necesitó de innovaciones genómicas que permitieran a las células comunicarse entre sí y adherirse las unas a las otras (Tyler, 2003; King, 2004). Las cadherinas, proteínas paradigmáticas de unión intercelular, son capaces de mediar fenómenos tanto de adhesión como de señalización, lo cuales son clave para que se den procesos de vital importancia como la morfogénesis tisular o la polarización celular (Nelson y Nusse, 2004). Hasta la fecha, las cadherinas sólo han sido encontradas en metazoos y sus parientes unicelulares más cercanos, los coanoflagelados (King et al., 2003), lo que ha alentado a numerosos grupos a realizar estudios sobre las cadherinas de éstos con el fin de comprender cómo se operó la transición desde los organismos unicelulares hasta los multicelulares (Steenkamp et al., 2006).

Más concretamente, gracias a estudios que emplean como modelo el coanoflagelado *M. brevicollis*, se ha propuesto la posibilidad de que las cadherinas primitivas, carentes de dominio citoplásmico de cadherina (CCD) y por lo tanto, incapaces de interactuar con β -catenina, pudieran interactuar con bacterias con el fin de reconocerlas y capturarlas (Abedin y King, 2008). Esto es consistente con el hecho de que, en la actualidad, varios microorganismos sean capaces de interactuar con cadherinas, provocando eventos de señalización en células epiteliales, como en el caso de la unión de *Listeria monocitogenes* a E-cadherina (Bonazzi et al., 2008) o la unión de *Candida albicans* a N-cadherina (Phan et al., 2013). Aunque no se ha postulado un mecanismo preferente mediante el cual se operó la transición entre la adhesión bacteriana y la adhesión homofílica intercelular, parece que la especialización de la asociación de los dominios intracelulares de las cadherinas con otras proteínas pre-existentes (como β - y α -catenina), así como con el citoesqueleto de actina, fue de suma importancia (Oda, 2012).

Las cadherinas clásicas de vertebrados han sido clasificadas en tres tipos en base a su estructura. Los tipos I (E-cadherina, N-cadherina) y II (VE-cadherina, OB-cadherina) se caracterizan por presentar 5 repeticiones EC (Dominio extracelular de cadherina), mientras que el tipo III (cHz-cadherina) se caracteriza por presentar entre 14 y 17 repeticiones EC. Parece probable que el último ancestro común de todos los animales dotados de bilateralidad poseyese cadherinas de tipo III (Oda, 2012). Sin embargo, las cadherinas de tipo III están ausentes en ascidias y el genoma placentario de mamíferos, lo que sugiere que

este tipo de cadherina se pudo perder de manera secundaria en diferentes momentos de la evolución de los animales bilaterales. Teniendo en cuenta que las formas más recientes de las diferentes cadherinas tienden a tener menos repeticiones EC y un menor número de dominios (Oda et al., 2002; Oda et al., 2005; Hulpiau y van Roy, 2011), se ha propuesto la “pérdida de domino específica de linaje” (*del inglés, lineage-specific domain loss*) como mecanismo principal de evolución de este tipo de proteínas. Así, la diversificación y especialización de las cadherinas a lo largo de la evolución pudo haber permitido el incremento de complejidad en cuanto a las asociaciones de distintas poblaciones celulares para formar organismos complejos.

3.2. Proteínas de uniones intercelulares en el endotelio vascular

A diferencia de otros tipos de células epiteliales, el endotelio vascular posee un sistema de uniones intercelulares bastante plástico. Los contactos entre células suelen ser de naturaleza compleja, existiendo un alto grado de solapamiento entre las células (Dejana, 2004). Más concretamente, las uniones pueden clasificarse en dos tipos principales: adherentes (*adherens junctions*) y oclusivas (*tight junctions*). Cabe señalar que, mientras que la mayoría de los epitelios las uniones oclusivas se encuentran concentradas en la parte más apical de la zona de contacto entre célula y célula, en el endotelio las uniones adherentes y oclusivas se entremezclan allí donde hay solapamiento entre células (Simionescu, 2000).

3.2.1. Uniones adherentes: VE-cadherina y proteínas asociadas

El principal componente de las uniones adherentes del endotelio vascular, identificado por vez primera a través de un “*screening*” de anticuerpos monoclonales dirigidos contra células endoteliales (Lampugnani et al., 1992), es la Cadherina Vascular Endotelial (VE-cadherina). Ésta se expresa *in vivo* en todo tipo de vasos, ya sean arteriales, venosos o linfáticos. Aparece en una etapa temprana de la diferenciación de células hematopoyéticas a endoteliales (Breier et al., 1996) y aunque no es imprescindible para la adquisición de características endoteliales, su ausencia interfiere en gran medida con el desarrollo del programa vascular (Carmeliet et al., 1999).

La proteína VE-cadherina forma parte de una superfamilia de receptores adhesivos dependientes de calcio que permiten la unión de células entre sí mediante interacciones homotípicas. Como cadherina clásica, VE-cadherina posee una estructura modular general compuesta por cinco dominios EC (repeticiones extracelulares, *del inglés extracellular repeats*) de unos 110 aminoácidos aproximadamente, denominados EC1-EC5 desde el extremo N- al C-terminal, así como un dominio transmembrana y una cola citoplásmica muy conservada (Hatta et al., 1988; Takeichi, 1990). Por un lado, la parte extracelular media interacciones homofílicas. Éstas requieren de la fijación de tres iones de calcio por sitio EC, lo cual confiere rigidez a la molécula de VE-cadherina, reduciendo así la probabilidad de ser proteolíticamente degradada (Taveau et al., 2008). Por otro, la cola citoplásmica se une a otras proteínas intracelulares, complejos que se pueden unir a su vez al citoesqueleto de actina (Gumbiner, 1996). Además, la estabilidad de los complejos de uniones intercelulares endoteliales depende en parte de la localización de los mismos en balsas lipídicas. En efecto, se ha demostrado que la VE-cadherina asociada a balsas lipídicas presenta una mayor asociación con p120-catenina (Gentil-dit-Maurin et al., 2010).

Las proteínas capaces de unirse al dominio citoplasmático de VE-cadherina podrían englobarse en diferentes categorías según su similitud estructural como, por ejemplo, la de las cateninas. En efecto, el dominio citoplásmico (*catenin-binding domain*, CBD) de VE-cadherina interacciona con β -catenina y γ -catenina (plakoglobina), proteínas que forman parte de la familia armadillo (Peifer et al., 1994) y capaces de asociarse a su vez con α -catenina, un homólogo de vinculina que desempeña un papel clave en la unión del complejo de cadherinas al citoesqueleto de actina (Nieset et al., 1997). Además, p120-catenina, también perteneciente a la familia armadillo, estabiliza los complejos cadherina-catenina en la superficie celular al interactuar con el dominio de la cola citoplásmica de VE-cadherina adyacente a la membrana (*juxtamembrane domain*, JMD) (Davis et al., 2003; Lampugnani y Dejana, 1997; Xiao et al., 2003).

Por otro lado, existen fosfatasa que se asocian a VE-cadherina, regulando negativamente su fosforilación y permitiendo el mantenimiento de la integridad vascular. Es el caso de la proteína tirosina-fosfatasa vascular endotelial (VE-PTP), proteína de membrana específica de endotelio. Se ha mostrado que VE-PTP es esencial para el remodelado vascular y que ratones que carecen de ella mueren en el estadio E9.5 de su desarrollo embrionario (Bäumer et al., 2006; Dominguez et al., 2007). SHP2 es otra proteína tirosina-fosfatasa que cumple una función similar a la anterior: en condiciones basales, se asocia a VE-cadherina mediante β -catenina. Sin embargo, en respuesta a trombina, se disocia y VE-cadherina es fosforilada en mayor medida e internalizada. También se ha descrito un importante papel en angiogénesis (Ukropec et al., 2000; Mannell et al., 2008). DEP-1 (del inglés, *density enhanced phosphatase-1*), es otra proteína tirosina-fosfatasa que se asocia a VE-cadherina vía β -catenina pero que no se disocia del complejo en respuesta a VEGF en células confluentes, participando en el mantenimiento de la integridad vascular y la inhibición de contacto (Lampugnani et al., 2006).

Otra proteína capaz de regular los complejos de uniones intercelulares es PECAM-1 (del inglés, *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*, Fernández-Martín et al., 2012). Es un receptor transmembrana de la superfamilia de las inmunoglobulinas capaz de mediar interacciones homofílicas entre células endoteliales adyacentes o entre células endoteliales y leucocitos. Su segmento citoplásmico cumple con una función estructural de soporte para distintas fosfatasa (como SHP2) (Bird et al., 1999) y otras proteínas de uniones intercelulares como (como β -catenina o γ -catenina) (Ilan et al., 1999; Ilan et al., 2000). Se ha postulado que PECAM-1 cicla entre la membrana plasmática y un compartimento subcelular bautizado como “Compartimento de Reciclaje del Borde Lateral” (del inglés, *Lateral Border Recycling Compartment*, LBRC) (Sullivan y Muller, 2014).

Existen muchas otras proteínas que participan en mayor o menor medida en la formación y mantenimiento de los complejos de uniones adherentes (Dejana y Vestweber, 2013), como por ejemplo la vinculina (Huveneers et al., 2012), así como su anclaje a los filamentos de actina, como la α -actinina (Tang y Blicher, 2012).

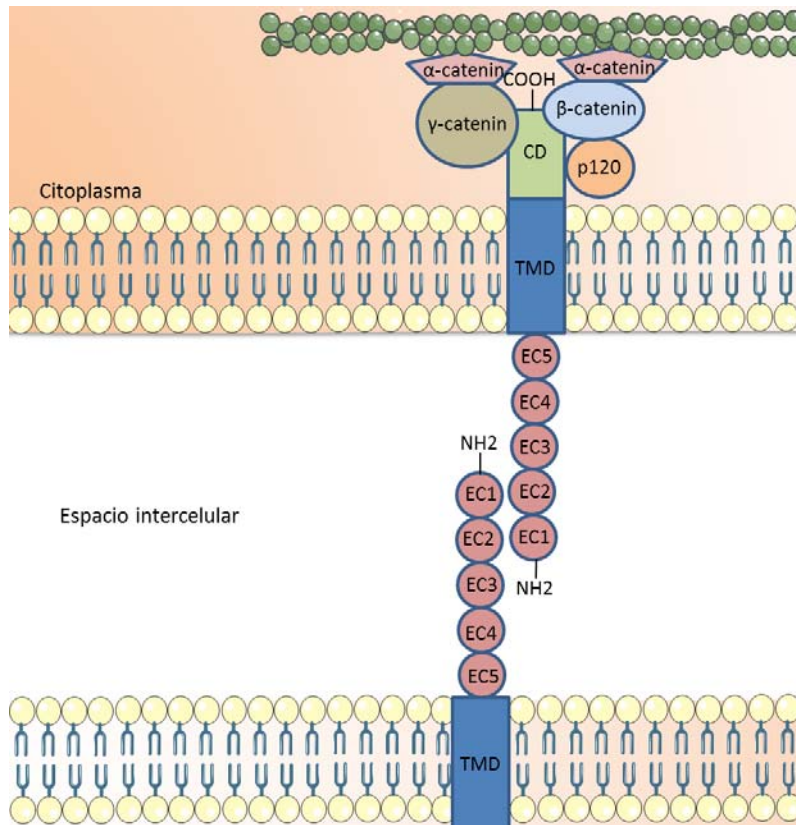


Ilustración 5. Estructura esquemática de VE-cadherina y principales proteínas asociadas. La proteína VE-cadherina consta de tres regiones bien diferenciadas. Por un lado, posee una región extracelular N-terminal con 5 repeticiones del dominio EC, responsable de la unión homofílica dependiente de Ca^{2+} . Por otro, una región transmembrana que permite su anclaje a la membrana plasmática. Finalmente, posee una cola citoplasmática C-terminal (*juxtamembrane domain*) donde se produce la interacción con las cateninas p120, β y γ . Estas dos últimas permiten la unión de este complejo de uniones intercelulares con α -catenina y el citoesqueleto de actina.

3.2.2. Uniones oclusivas

Aunque en términos absolutos, las proteínas de uniones oclusivas representan una quinta parte de los complejos de unión intercelular (Mehta y Malik, 2006), son esenciales para mantener la integridad del endotelio. Principalmente, las uniones oclusivas endoteliales están formadas por la adhesión homotípica de ocludinas y claudinas (Bazzoni y Dejana, 2004). Ocludina se expresa tanto en células epiteliales como endoteliales y requiere de la co-expresión de la proteína *zonula occludens-1* (ZO1) para poder situarse a nivel de la membrana plasmática. Las proteínas ZO1-3 son componentes intracelulares que permiten anclarse al citoesqueleto de actina cortical. De los 24 miembros de la familia de las claudinas, sólo Claudina-5 parece ser una isoforma específica de endotelio (Morita et al., 1999). Así, las proteínas ZO permiten unir claudinas y ocludinas al citoesqueleto de actina a través de otra proteína llamada cingulina (Cordenonsi et al., 1999).

Otro grupo de proteínas implicado en la formación de uniones oclusivas es el de las Moléculas de Adhesión de Uniones, del inglés, *Junctional Adhesion Molecules*, JAM. Éstas, al igual que PECAM, pueden establecer uniones homo- y heterofílicas, por lo que son capaces de mediar tanto la permeabilidad endotelial como la trans migración leucocitaria (Weber et al., 2007). JAM-A, B y C son expresadas en endotelio y se asocian a componentes de las uniones oclusivas como ZO1 (Bazzoni et al., 2000).

3.3. Dinámica de VE-cadherina y disrupción de uniones intercelulares.

Como se ha descrito en el apartado anterior, las uniones intercelulares del endotelio vascular están formadas por un gran número de proteínas con diversas funciones. Es justamente esta complejidad estructural la que sienta las bases para que tenga lugar una fina regulación de la cohesión celular en respuesta a diferentes estímulos, como aquellos que tienen lugar en un contexto inflamatorio.

3.3.1. Síntesis, tráfico y degradación de VE-cadherina.

La proteína VE-cadherina es expresada en células endoteliales principalmente a través de los factores de transcripción Ets1 y de la familia HIF (del inglés, *hipoxia inducible factor*) (Lelièvre et al., 2000; Le Bras et al., 2007; Kobayashi et al., 2015). La cantidad total de VE-cadherina presente en células endoteliales podría subdividirse en dos poblaciones, la intracelular, la cual se sitúa mayoritariamente en un compartimento perinuclear, y la de superficie. VE-cadherina, al igual que otras cadherinas, está continuamente siendo internalizada desde la superficie hacia el citoplasma para luego ser redirigida de nuevo a la membrana o degradada (Le et al., 2002; Xiao et al., 2003).

Más concretamente, la internalización de VE-cadherina se produce de una manera dependiente de clatrina (Xiao et al., 2005) a través de un compartimento endosomal positivo para la GTPasa Rab5 (Yang et al., 2015). Una vez en el interior de la célula, VE-cadherina puede seguir dos vías diferentes. Por un lado, la vía degradativa parece ser modulada por las GTPasas Rab7 o Rab9, las cuales regulan el tráfico hacia endosomas tardíos y lisosomas (Chichger et al., 2015). Por otro, VE-cadherina puede seguir la vía de reciclaje mediada por las GTPasas Rab4, Rab11a y su efector Rab11-FIP2, así como la proteína adaptadora p18 (Chichger et al., 2015a; Chichger et al., 2015b; Yan et al., 2016).

Hasta donde llega nuestro conocimiento, apenas existen estudios sobre la maquinaria molecular implicada en la internalización y el reciclaje de VE-cadherina. Por ejemplo, en 2015 se publicó que el LPS bacteriano induce un aumento en los niveles de expresión de la GTPasa Rab5 (Yang et al., 2015) y puede también fosforilar p18 (Chichger et al., 2015a). Sin embargo, no se ha reportado que TNF regule dichas vías de internalización, degradación y/o reciclaje, razón por la cual hemos decidido ahondar en la comprensión de dichos fenómenos a lo largo de esta tesis.

3.3.2. Mediadores inflamatorios y angiogénicos que inducen la internalización de VE-cadherina.

La citoquina TNF, además de inducir la formación de fibras de estrés a través de la vía Rho-ROCK (Kimura et al., 1996), promueve una serie de alteraciones a nivel de las uniones intercelulares en el endotelio vascular.

Por un lado, TNF aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la activación del complejo NOX (NADPH oxidasa), el cual contiene la GTPasa Rac activa (Konior et al., 2014). Las ROS provocan la oxidación de múltiples residuos de proteínas fosfatasa (SHP2) y quinasas (Src, Pyk2, PAK) que provocan un aumento de la fosforilación de VE-cadherina (Corcoran y Cotter, 2013; Monaghan-Benson y Burridge, 2009). En consecuencia, β -catenina y p120-catenina se disocian de VE-cadherina y ésta se

internaliza, aumentando por tanto la permeabilidad del endotelio, sin necesidad de crear huecos intercelulares (Nwariaku et al., 2002; Esser et al., 1998).

Por otro, algunos estudios sugieren que TNF, además de regular la expresión de JAM-A y JAM-B en células endoteliales (Ueki et al., 2008), también provoca el corte proteolítico de JAM-A y la dispersión de esta molécula fuera de las uniones intercelulares (Martínez-Estrada et al., 2005).

TNF también induce un aumento de la fosforilación de PECAM-1, implicando un refuerzo de la asociación con proteínas portadoras de dominio SH2, lo cual favorece la dispersión de PECAM-1 desde los contactos intercelulares hacia el resto de la membrana plasmática (Ferrero et al., 1996; Romer et al., 1995; Fernández-Martín et al., 2012).

Sin embargo, aunque en los últimos años se han publicado algunos trabajos que versan sobre el efecto de TNF en la morfología de las uniones intercelulares (Millán et al., 2010; Huveneers et al., 2012), el conocimiento del efecto de dicha citoquina sobre la dinámica de VE-cadherina sigue siendo fragmentario.

Por otro lado, el tráfico de VE-cadherina también se ve modulado en respuesta a VEGF. En efecto, se ha demostrado que la citoquina VEGF-A se une a VEGFR1 y VEGFR2, induciendo la dimerización y fosforilación de VEGFR2 a un tiempo muy temprano (Waltenberger et al., 1994), activándose una serie de vías de señalización solapantes que culminan con el aumento de la internalización de VE-cadherina.

Además, la activación de VEGFR2 induce el reclutamiento de la proteína TSAd, la cual se une a la quinasa c-Src (Sun et al., 2012). Ésta fosforila VE-cadherina y provoca su internalización seguida de degradación o reciclaje, en función del contexto en el que se encuentre el endotelio.

Finalmente, Gavard y Gutkind demostraron que la activación de VEGFR2 también provoca la fosforilación Src-dependiente de Vav2, GEF que activa Rac. A su vez, Rac activa la quinasa PAK que fosforila VE-cadherina, resultando en el reclutamiento de la β -arrestina2 y, por ende, la internalización de VE-cadherina y el aumento de la permeabilidad endotelial (Gavard y Gutkind, 2006).

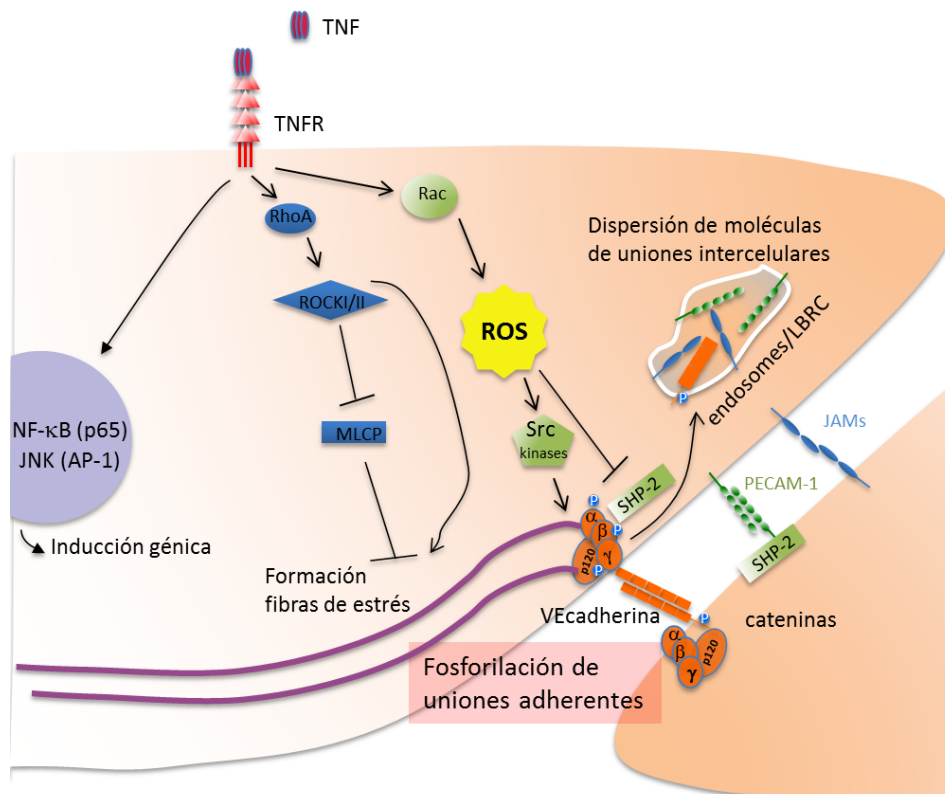


Ilustración 6. Representación esquemática de las principales vías de señalización intracelular activadas por TNF. En células endoteliales, la unión de TNF a su receptor TNFR provoca una serie de cascadas de señalización con una multiplicidad de efectos. Por un lado, se induce la transcripción de genes por las vías de NF- κ B y JNK, lo cual favorece el aumento de los niveles de ciertas proteínas endoteliales implicadas en la respuesta inflamatoria. Por otro, se produce la activación de la vía Rho/ROCK que confluye hacia la generación y estabilización de fibras de estrés. Además, la activación de Rac favorece la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) que provocan la fosforilación y dispersión de proteínas de uniones intercelulares como VE-cadherina mediante la activación de quinasas de la familia Src y la inhibición de fosfatasas como SHP2. Éstas podrán ser internalizadas en compartimentos endosomales o incluso en el compartimento de reciclaje del borde (LBRC).

4. BONE-MARROW STROMAL T-CELL ANTIGEN 2 (BST-2).

La proteína BST-2 (también conocida como HM1.24, CD317 o tetherina) fue originalmente identificada como un antígeno de superficie de células B plenamente diferenciadas (Goto et al., 1994). Se ha propuesto que BST-2 sirve como diana en inmunoterapia contra mielomas, por cuanto anticuerpos de ratón humanizados monoclonales contra BST-2 exhiben una potente actividad antitumoral in vitro (Ozaki et al., 1997; Ono et al., 1999). BST-2 fue redescubierta como un factor de restricción viral inducido por interferón- α , el cual inhibe la liberación de partículas virales de HIV-1 en la superficie celular y cuya acción es contrarrestada por Vpu, proteína accesoria del VIH-1. En efecto, Vpu ubiquitina la proteína BST-2 y la dirige hacia rutas degradativas (Neil et al., 2008; Van Damme et al., 2008).

El gen *BST-2* posee múltiples sitios de unión de factores de transcripción en su región promotora (AP-2, CREB, SP-1, STAT3, IFR1/2, ISGF3), lo cual indica que la transcripción de *BST-2* está altamente regulada por citoquinas como interferón- α/β e interleukina-6 (Blasius et al., 2006; Kawai et al., 2008).

BST-2 está constituida por 180 aminoácidos y posee un dominio citosólico N-terminal de 21 aminoácidos, un dominio transmembrana de 22 aminoácidos, un dominio extracelular con dos sitios de N-glicosilación y anclaje GPI (Glicosil-fosfatidil-inositol) C-terminal que cumple una función de anclaje a balsas lipídicas de la membrana plasmática (Ohtomo et al., 1999). Se ha demostrado que se forman dímeros de *BST-2* espontáneamente a través de su región coiled-coil, los cuales son estabilizados por la formación de puentes disulfuro entre tres pares de residuos de cisteína situados en el dominio extracelular (Andrew et al., 2009; Hinz et al., 2010).

En células epiteliales, se ha descrito que *BST-2* se sitúa predominantemente en el dominio apical de las células (Rollason et al., 2009) aunque en otros tipos celulares se puede encontrar mayoritariamente en la red trans-Golgi (Li et al., 2007). *BST-2* posee un motivo de internalización (YxY) que permite su endocitosis mediada por clatrina mediante proteínas adaptadoras como AP-2 (más concretamente, su subunidad α -adaptina), epsina, eps15 o β -arrestina (Rollason et al., 2007; McMahon y Boucrot, 2011). Además, este motivo también está implicado en la estimulación de la actividad de NF- κ B (Tokarev et al., 2013)

Se ha descrito que *BST-2* circula continuamente entre la membrana plasmática y la red-trans Golgi a través de endosomas de reciclaje (Kupzig et al., 2003; Rollason et al., 2007; Masuyama et al., 2009). Habida cuenta de que la vida media de *BST-2* parece ser de unas 4 h, podría ser que esta proteína sea reciclada varias veces entre la membrana plasmática y endosomas de reciclaje y eventualmente sufrir una degradación mediada por el sistema ESCRT (Janvier et al., 2011) o vía proteasoma, mediante ubiquitinación (Fujita et al., 2012).

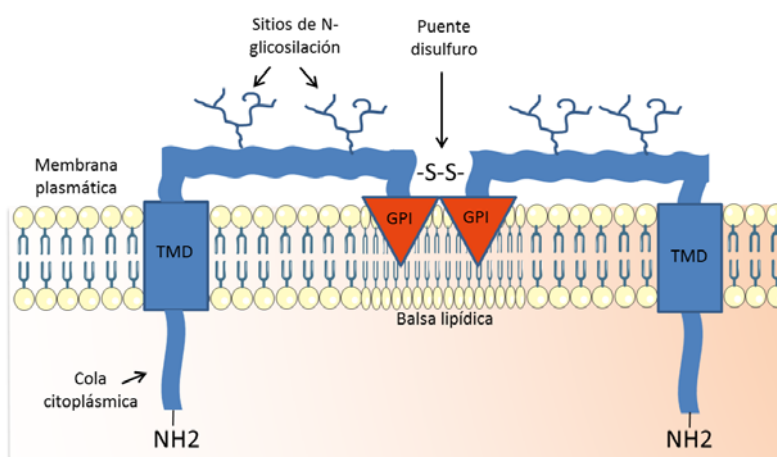


Ilustración 7. Estructura esquemática de *BST-2* La proteína *BST-2* consta de una cola citoplásmica N-terminal, un dominio transmembrana, una región extracelular con varios sitios de N-glicosilación y un residuo de cisteína capaz de generar puentes disulfuro con otras moléculas de *BST-2*, formándose así un dímero. *BST-2* posee un anclaje GPI C-terminal que le permite asociarse a balsas lipídicas.

5. ALTERACIÓN DE LA DINÁMICA DE VE-CADHERINA DURANTE LA INFECCIÓN DEL ENDOTELIO VASCULAR POR *NEISSERIA MENINGITIDIS*

Neisseria meningitidis, también conocido como meningococo, es una bacteria Gram-negativa, comensal de la nasofaringe humana y, como tal, una bacteria saprófita normal que se transmite de individuo a individuo. *Neisseria meningitidis* puede por tanto diseminarse en una comunidad por contacto directo. En una pequeña proporción de sujetos portadores, la bacteria puede pasar al torrente circulatorio, atravesando la barrera hematoencefálica, invadiendo las meninges y causando lesiones vasculares periféricas. En infecciones leves, la bacteremia meningocócica se suele asociar con lesiones trombóticas en micro-vasos y con pequeños edemas responsables de lesiones purpúricas en la piel. En infecciones más severas, esta invasión bacteriana puede ocasionar *purpura fulminans*, la cual se caracteriza por una trombosis extensa, la presencia de lesiones purpúricas necróticas y aumento masivo de permeabilidad vascular endotelial (Coureuil et al., 2014).

Se han identificado dos receptores que, de manera cooperativa, son necesarios para que se dé la interacción entre las células endoteliales y *Neisseria meningitidis*. El primer evento (adhesión) radica en la unión de los Pili de tipo IV (del inglés, *type four pili*, *Tfp*) a una proteína transmembrana, CD147 (también conocida como EMMPRIN o basigina), el cual es un miembro de la familia de las inmunoglobulinas (Bernard et al., 2014; Iacono et al., 2007). El segundo evento (señalización) estriba en la interacción de las Tfp con el receptor β 2-adrenérgico (Coureuil et al., 2010). Ambos receptores quedan confinados en las zonas de contacto entre las células endoteliales y el meningococo.

En un contexto fisiológico, el receptor β 2-adrenérgico responde a catecolaminas circulantes, controlando la homeostasis vascular y señaliza a través de proteínas G heterotriméricas y β -arrestinas, las cuales son proteínas de andamiaje implicadas en múltiples procesos celulares como la des-sensibilización de receptores, internalización y señalización (DeWire et al., 2007). Sin embargo, las pilinas PilE y PilV del complejo Tfp activan el receptor β 2-adrenérgico de una manera diferente a como lo hacen sus ligandos naturales. En efecto, sólo se activa la vía dependiente de β -arrestina y no la clásica vía de activación de la adenilil-ciclasa. Este fenómeno se conoce como activación sesgada (Coureuil et al., 2010; Drake et al., 2008). En consecuencia, el receptor β 2-adrenérgico no es internalizado, si no que permanece secuestrado en superficie por la bacteria y activa de manera continua las vías de señalización durante períodos más largos que los habituales.

Esta activación sostenida de la vía β 2-AR/ β -arrestina induce la acumulación varios tipos de moléculas bajo las colonias bacterianas en una estructuras denominadas placas corticales (Doulet et al., 2006; Coureuil et al., 2009). Por un lado, se produce un incremento de la polimerización de actina mediado por Rho GTPasas y el complejo Cortactina-Arp2/3 y la tirosina quinasa Src. Este fenómeno permitiría la formación de protrusiones entre las cuales las colonias bacterianas podrían guarecerse de las fuerzas ejercidas por la corriente del torrente sanguíneo (Coureuil et al., 2009). Por otro, se produce una deslocalización del complejo de polaridad PAR3/6 hacia los sitios de contacto entre *Neisseria meningitidis* y las células endoteliales, lo cual provoca un confinamiento de receptores que participan en la

transmigración leucocitaria como CD44 o ICAM-1 (Doulet et al., 2006) y de proteínas de uniones intercelulares como VE-cadherina, p120-catenina y claudina (Coureuil et al., 2009) en unas estructuras que rodean las colonias y recuerdan la forma de un “panal de abeja”. Así, la adhesión leucocitaria es inhibida y las uniones intercelulares se vuelven más laxas, abriéndose una ruta paracelular que podrán seguir las bacterias para invadir los tejidos subyacentes (Coureuil et al., 2014).

Además de los eventos de señalización provocados de manera específica por *Neisseria meningitidis*, esta bacteria también puede inducir la síntesis y liberación al medio de una amplia abanico de citoquinas proinflamatorias por parte de las células infectadas, fenómeno conocido como “tormenta de citoquinas” (Chong y Sriskandan, 2011). Se ha descrito que, a través de las vías de señalización de los receptores de tipo Toll (TLR-2 y TLR-4), las células infectadas por *Neisseria* pueden inducir la vía de NF- κ B (Dietrich et al., 2011) y por tanto la expresión de TNF, IL-6 e IL-8, entre otras citoquinas (Zughaier, 2011). Este hecho sugiere que los mecanismos de regulación de la permeabilidad endotelial mediados por TNF y demás citoquinas proinflamatorias podrían también desempeñar un papel importante en el contexto de la infección bacteriana.

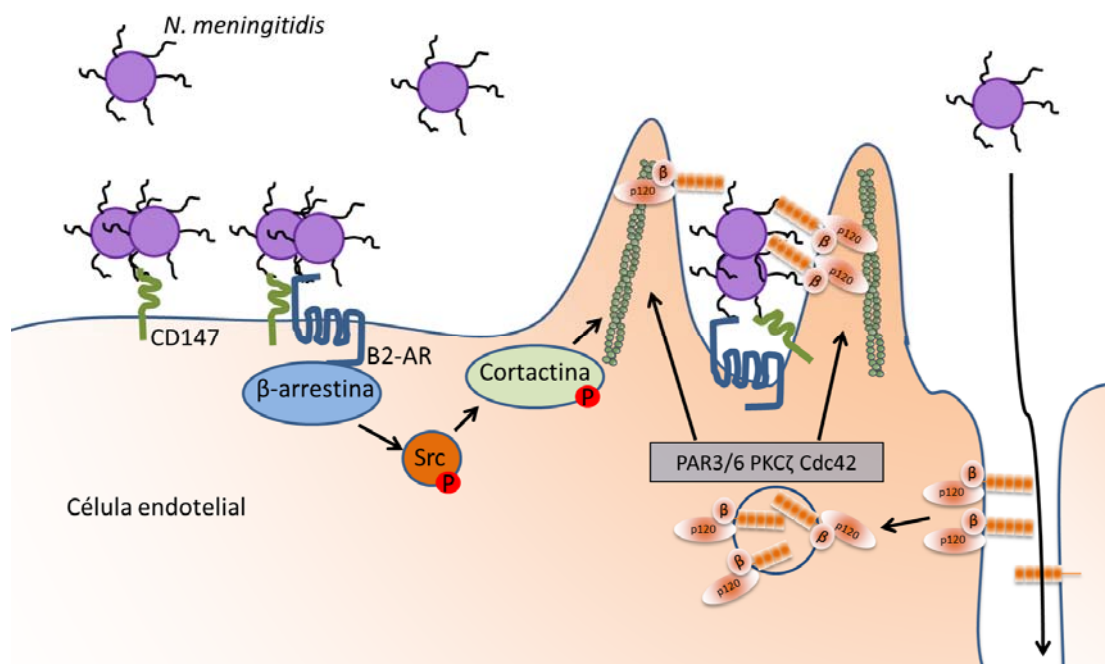


Ilustración 8. Esquema de la señalización intracelular inducida por la interacción entre *Neisseria meningitidis* y las células endoteliales. *Neisseria meningitidis* es capaz de unirse mediante sus pili al receptor CD147 presente en la superficie de las células endoteliales. Posteriormente, se produce el reclutamiento del receptor β-2-Adrenérgico (β2-AR) bajo los puntos de contacto bacterianos, el cual recluta a su vez a la β-arrestina, fosforilándose secuencialmente Src y Cortactina y formándose en consecuencia protrusiones de membrana bajo las colonias bacterianas mediante la polimerización de actina. Además, los complejos de polaridad formados por PAR3/6, PKCζ y Cdc42 quedan confinados también bajo las colonias bacterianas, produciéndose una redirección y “secuestro” de proteínas de uniones intercelulares dispersadas e internalizadas en respuesta a respuesta inflamatoria desencadenada por la infección. Así, las uniones intercelulares endoteliales se debilitan, la función de barrera queda comprometida y las bacterias pueden acceder al tejido subyacente.

OBJETIVOS

Objetivos

El TNF es una citoquina proinflamatoria que induce un aumento de la permeabilidad endotelial. Esta modulación de la función de barrera puede estribar en mecanismos tanto dependientes como independientes de la reorganización de las uniones intercelulares. En este sentido, a lo largo de este trabajo, nos proponemos:

- 1- Estudiar el papel de las GTPasas RhoB y Rac1 en la recuperación de la función de barrera independiente de las uniones intercelulares en células microvasculares humanas en un contexto inflamatorio inducido por la citoquina TNF.
- 2- Caracterizar el efecto de TNF sobre las uniones intercelulares endoteliales, centrándonos en la regulación de la degradación y la síntesis de VE-cadherina.
- 3- Identificar nuevas proteínas implicadas en la regulación de la dinámica de VE-cadherina en respuesta a TNF en células endoteliales humanas.
- 4- Investigar la posible implicación de alguna de dichas proteínas en la alteración de la barrera endotelial humana tras la infección por *Neisseria meningitidis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Anticuerpos

1.1.1. Anticuerpos primarios

Los anticuerpos primarios empleados en inmunodetección (WB) y en inmunofluorescencia (IF) quedan consignados en la tabla 1:

Tabla 1. Anticuerpos primarios

Proteína	Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
α -catenina	Anti- α -catenina	conejo	ABCAM EP1793Y	1:1000	-
β -catenina	Anti- β -catenina	conejo	Sigma c2206	1:1000	1:500
β -tubulina	Anti- β -tubulina	conejo	Santa Cruz Biotechnology, INC sc-9104	1:1000	-
BST-2	Anti-BST-2	ratón	Abnova M15 (clone 2E6)	1:1000	1:500
BST-2	Anti-BST-2	conejo	Dra. Clarisse Berlioz-Torrent, Institut Cochin	1:5000	-
mCherry	Anti-mCherry	conejo	Genetex GTX59788	-	1:1000
Clathrin heavy chain	Anti-Clathrin heavy chain	ratón	Sigma-Aldrich C1860	1:1000	-
EHD1	Anti-EHD1	conejo	NOVUS Biologicals NBP1-95547	1:1000	1:500
ERK1/2	Anti-ERK1 (K23)	conejo	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-94	1:1000	-
Ets1	Anti-Ets1	ratón	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-350	1:1000	1:500
FLAG	Anti-FLAG	conejo	Sigma-Aldrich F3165	-	1:500
GAPDH	Anti-GAPDH	ratón	ABCAM Ab-8245	1:5000	-
Hemagglutinina (HA)	Anti-HA	rata	ROCHE 11867423001	-	1:500
ICAM-1	Anti-ICAM-1	conejo	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-7891	1:1000	-

JNK	Anti-JNK	conejo	Cell Signaling 9252	1:1000	-
pJNK	Anti-pJNK	conejo	Cell Signaling 9251	1:1000	-
myc	9E10	ratón	ROCHE 11667203001	-	1:500
N-cadherina	Anti-N- cadherina	ratón	Sigma-Aldrich C3865	1:1000	1:500
Plakoglobina	Anti- Plakoglobina	ratón	Thermo-Fischer (PG-11E4)	1:1000	-
Rac1	Anti-Rac1	ratón	BD Transduction Laboratories 610650	1:1000	-
RhoA	Anti-RhoA (26C4)	ratón	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-418	1:500	-
RhoB	Anti-RhoB (119)	conejo	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-180	1:250	-
RhoB	Anti-RhoB (C5)	ratón	Santa Cruz Biotechnology INC. sc-8048	1:250	1:250
RhoC	Anti-RhoC (D40E4)	conejo	Cell Signaling 12/2013	1:1000	-
RhoC	Anti-RhoA (119)	conejo	Sc-179	1:100	-
VE-cadherina	Anti- cadherina-5	ratón	BD Transduction Laboratories 610252	1:1000	1:500
VE-cadherina (Bloqueante)	Anti- cadherina-5	ratón	BD Transduction Laboratories 610251	-	-
VE-cadherina (Marcador de superficie)	Anti- cadherina-5	ratón	Enzo Life Sciences (BV6)	-	1:50
VE-cadherina	Anti- cadherina-5	conejo	Cell Signaling	1:1000	1:500

1.1.2. Anticuerpos secundarios

En la siguiente tabla quedan listados los anticuerpos secundarios utilizados en inmunoblot y en inmunofluorescencia:

Tabla 2. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Especie	Referencia	Dilución WB	Dilución IF
Anti-IgGs cabra HRP	burro	Jackson ImmunoResearch 705-036-147	1:5000	-
Anti-IgGs conejo HRP	burro	GE Healthcare NA934V	1:5000	-
Anti-IgGs ratón HRP	burro	Jackson ImmunoResearch 715-035-151	1:5000	-
Anti-IgGs conejo Alexa 488	burro	ThermoFischer A-21206	-	1:500
Anti-IgGs rata Alexa 488	burro	ThermoFischer A-21208	-	1:500
Anti-IgGs ratón Alexa 488	burro	ThermoFischer A-21202	-	1:500
Anti-IgG1 ratón Alexa 488	cabra	ThermoFischer A-21121	-	1:500
Anti-IgGs conejo Alexa 555	burro	ThermoFischer A-31572	-	1:500
Anti-IgGs rata Alexa 555	cabra	ThermoFischer A-21434	-	1:500
Anti-IgGs ratón Alexa 555	burro	ThermoFischer A-31570	-	1:500
Anti-IgG2a ratón Alexa 555	cabra	ThermoFischer A-21137	-	1:500
Anti-IgGs conejo Alexa 647	burro	ThermoFischer A-31573	-	1:200
Anti-IgGs rata Alexa 647	burro	ThermoFischer A-21247	-	1:200
Anti-IgGs ratón Alexa 647	burro	ThermoFischer A-31571	-	1:200

1.2. Reactivos

Los reactivos empleados a lo largo de esta tesis doctoral quedan resumidos en la siguiente tabla:

Tabla 3. Reactivos

Reactivo	Referencia	Casa comercial
Biotina	B4501	Sigma-Aldrich
BrefeldinaA	20350-15-6	Sigma-Aldrich
Cloroquina fosfato	C6628	Sigma-Aldrich

Cloruro de amonio	A9434	Sigma-Aldrich
DAPI	10236276001 ROCHE	Sigma-Aldrich
EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin	21217	Thermo Scientific
Faloidina-Alexa647	A-22287	Invitrogen
Faloidina-TRITC	P-1951	Sigma
Fibronectina humana	86088-83-7	Sigma-Aldrich
Glutathione Sepharose 4B	17-0756-01	GE Healthcare
IgG de suero de ratón	I5381	Sigma-Aldrich
Interleuquina-1 β	201-LB	R&D Systems
Lactacystin	Sc-3575	Santa Cruz Biotechnology
MG132	M8699	Sigma-Aldrich
Neutravidin-agarose	29200	Thermo-Scientific
Oligofectamin 2000	12252-011	Invitrogen
PEI	23966	Polysciences, Inc
TNF	210-TA/CF	R&D Systems
Trombina	T6884	Sigma

1.3. Plásmidos

Los plásmidos utilizados a lo largo de esta tesis son los siguientes. Además, se indica el marcador que coexpresan asociado a la proteína de interés:

Tabla 4. Plásmidos

Plásmido	Expresión	Epítipo	Procedencia
BST-2-HA Δ GPI	BST-2 Δ GPI	HA	Dr. Paul Bieniasz (Howard Hughes Medical Institute, Rockefeller University, New York)

BST-2-FLAG mutantes (ver Fig. 38 para detalle de las mutaciones)	BST-2	FLAG	Dra. Clarisse Berlioz-Torrent (Institut Cochin, INSERM, París)
GFP	GFP	-	Clontech
GFP-Rab4	Rab4	GFP	Dra. R. Puertollano (National Institute of Health, Bethesda)
GFP-Rab5	Rab5	GFP	Dra. R. Puertollano (National Institute of Health, Bethesda)
GFP-Rab7	Rab7	GFP	Dra. R. Puertollano (National Institute of Health, Bethesda)
GFP-Rab11	Rab11	GFP	Dra. R. Puertollano (National Institute of Health, Bethesda)
GFP-RhoB	RhoB	GFP	Dra. Dolores Pérez Sala (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid)
HA-RhoB V14	RhoB constitutivamente activo	HA	Dra. Dolores Pérez Sala (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid)
mCherry-Rac1	Rac1	mCherry	Prof. Anne Ridley (Kings College, London, U.K.)
RhoB 3XHA- tagged (N- terminus)	RhoB	HA	UMR cDNA Resource Center University of Missouri-Rolla, 1870 Miner Circle Rolla, MO 65409
RhoB-BirA-HA	RhoB	BirA-HA	Construcción propia

1.4. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados en los experimentos de PCR cuantitativa fueron sintetizados por Sigma-Aldrich y los oligonucleótidos para los experimentos de interferencia (ARN de interferencia o siARN) fueron obtenidos de la colección prediseñada siGenome de Dharmacon (Chicago, IL) o diseñados por el servicio de Genómica del CBMSO y obtenidos mediante la herramienta Custom siRNA de Dharmacon. Sus secuencias quedan detalladas en la siguiente tabla:

1.4.1. Oligonucleótidos

Tabla 5. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'-3'
Primers Screening Rho GTPasas	
Primers Cdc42	Izquierdo: TGGATACAAAACCTATTTTCAGCAATGC Derecho: GTAGGATATCAGGAGACATGTTTACC
Primers Rac1	Izquierdo: ACACCTTGCTCTCCTATGTAGTTCTC Derecho: TCACTCCATTACAGTACAATGTTATGTC
Primers Rac2	Izquierdo: GCAAGACCTGCCCTTCATCA Derecho: GCTGTCCACCATCACATTGG
Primers Rac3	Izquierdo: GTACATCCCCACCGTTTITG Derecho: GGCTCACCAGAGAGAAGCAG
Primers RhoA	Izquierdo: CAACTATGATTATTAACGATGTCCAACC Derecho: TGGTGTGTCAGGTGGGAGTG
Primers RhoB	Izquierdo: CCCACCGTCTTCGAGAACTA Derecho: CACCGAGAAGCACATGAGAA
Primers RhoC	Izquierdo: ACCTGCCTCCTCATCGTCTTC Derecho: CACCTGCTTGCCGTCCAC
Primers RhoD	Izquierdo: GTGAATCATTTCTGCAAGAAGG Derecho: GCTTGTTCACCAGTGATTG
Primers RhoF	Izquierdo: GTCTATCTGGTAGTGGGTAAAC Derecho: AGGATACAGTGGTGCCTATC
Primers RhoG	Izquierdo: TGGGAACACTGGGTATTCTCATG Derecho: CACCACAATAGGCAGCAACAAC
Primers RhoH	Izquierdo: GAGAAGTAACATTCTGCAAATCGC Derecho: AGCACACGCCATTTCAGCAAG
Primers RhoQ/TC10	Izquierdo: TGTGAAAGAGGAGTGGGTAC Derecho: TAAAGTTTGGGGTCATCTCG
Primers RhoU/Wrch1	Izquierdo: AAATGGGTGCCGGAGATTTCG Derecho: CCAACTCAATGAGGACTTTGACATC
Primers RhoV/Chp	Izquierdo: GTCAGTCACCTCCGAGCAGTTTG Derecho: CCCTCCATAATGCCAAGCGTTCC
Primers RhoBTB1	Izquierdo: GCAAGCAGTATTGGATTATCTC Derecho: TGGTCAACTCCTGAACGG
Primers RhoBTB2	Izquierdo: GAGGGACCCCTGACATTTCAC Derecho: CATTAACGGGACACCACTACATG
Primers Rnd1	Izquierdo: CTATCCAGAGACCTATGTGCC Derecho: CGGACATTATCGTAGTAGGGAG
Primers Rnd2	Izquierdo: TCCTGATTCTGATGCTGTGCTC Derecho: ATTGGGGCAGAACTCTTGAGTC
Primers Rnd3-1st set	Izquierdo: GTCCGCCCCCTCTCTTAC Derecho: TCCAGGGTCTCTGGTCTACTG
Primers Rnd3-2nd set	Izquierdo: ACTATGACAATGTCCGCCCC Derecho: TCTGGTCTACTGATGTCAAAGCAAAT
Primers RhoA	Izquierdo: GAAGAGGCTGGACTCGGATT Derecho: TCACCAACAATCACCAGTTTCT
Primers RhoB	Izquierdo: TATGTGGCCGACATTGAGG Derecho: GCGGTCGTAGTCCTCCTG

Primers RhoC	Izquierdo: CCGGAGGTCTACGTCCCTAC Derecho: ATAGTCTTCCTGCCCTGCTG
Primers β -actina	Izquierdo: CAGGCACCAGGGCGTG Derecho: GTGAGGATGCCTCTCTTGCTCT

Primers Screening proteínas inducidas por TNF

Primers EHD1-01	Izquierdo: GTTTGGCAACGCTTTCCTC Derecho: TCGATGATGCTGATGCTGTC
Primers EHD1-02	Izquierdo: CAGGAAGCTCAATGACCTGAT Derecho: AAGACATTGGGCATCTCTTTCT
Primers RPTPk-01	Izquierdo: CCAATTTTGCTCAACTTATTGTGA Derecho: TGTAGGCCCAACACCAAGA
Primers RPTPk-02	Izquierdo: TTTGCTCAACTTATTGTGAGAGAAC Derecho: AATATGTAGGCCCAACACCAA
Primers Robo-1	Izquierdo: TTACCAGAGAGGAGGCGAAG Derecho: GGCAGGTTCACCTGATGTTGAG
Primers Jagged-1	Izquierdo: GAATGGCAACAAAACCTTGCAT Derecho: AGCCTTGTCGGCAAATAGC
Primers ICAM-1	Izquierdo: CCTTCCTCACCGTGTACTGG Derecho: AGCGTAGGGTAAGGTTCTTGC
Primers BST-2-01	Izquierdo: CCACCTGCAACCACACTG Derecho: CCTGAAGCTTATGGTTTAATGTAGTG
Primers BST-2-02	Izquierdo: GGAGCTTGAGGGAGAGATCA Derecho: TTCTTGTCCGCGATTCTCA
Primers β -actina	Izquierdo: CAGGCACCAGGGCGTG Derecho: GTGAGGATGCCTCTCTTGCTCT

Primers clonajes

Primers RhoB-BirA-HA	5' GGAAGATCTGGCGGCGGCGGCCATCCGCAAGAAGCTGGTG 3' CCCGGGGAATTTCGATCATAGCACCTTGCAGCAGTTGAT
----------------------	---

1.4.2. ARN de interferencia

Tabla 6. ARN de interferencia

Nombre	Secuencia 5'-3'
D-001210-01	
(siControl 1)	AUGUAUUGGCCUGUAUUAGUU
D-001810-01	
(siControl 3)	UAGCGACUAAACACAUCAA
D-003860-01	
(siRhoA)	AUGGAAAGCAGGUAGAGUUUU

D-008395-07	
(siRhoB7/1)	GCAUCCAAGCCUACGACUA
D-008395-09	
(siRhoB9/2)	CAUCCAAGCCUACGACUAC
D008555-02	
(SiRhoC)	AUAAGAAGGACCUGAGGCAUU
D-002887-01/02/03/04	GAUAAAUCCUGUCAGUCUU
(siEts1 pool)	GGACCGUGCUGACCUCAAU
	GGAAUUACUCACUGAUAAA
	GCAUAGAGAGCUACGAUAG
s502690	GAGAAGGGCCUCUGGAGCAtt
(siBST-2 3'UTR)	
S502689	CCACCCUGAGAUUGGGCAUtt
(siBST-2 17)	
TMOSLR-002919	CGGCUUUUCGCUUGAACAUUU
(siBST-2 19)	
NM_001795	GGAACCAGAUGCACAUUGA
(siCDH5/VE-cadherina)	
J-004204-06-0005	GAAGUAGAGUACCGAAUGA
(siRPTP κ)	

2. MÉTODOS

2.1. Cultivos primarios, líneas celulares, medios y condiciones de cultivo

Cultivos primarios humanos:

HUVEC (células endoteliales primarias humanas de vena de cordón umbilical)

HDMVEC (células endoteliales primarias humanas microvasculares dermales)

Líneas celulares humanas:

EA.hy.926 (línea endotelial inmortalizada derivada de HUVEC)

HBMEC (línea endotelial inmortalizada derivada en endotelio de médula ósea)

HCMEC/D3 (línea endotelial inmortalizada derivada de barrera hematoencefálica)

HEK293 (línea derivada de riñón de embrión)

Cepas bacterianas:

Neisseria meningitidis 2C43

Las HUVEC se obtuvieron a través de la casa comercial Lonza (CC-2519, pool de cinco donantes) o bien se extrajeron directamente a partir de cordones umbilicales frescos generosamente donados por el Dr. Santiago Lamas (CBMSO, Madrid), provenientes de la clínica Ruber Internacional de Madrid. Éstas se cultivaron en medio EBM-2 (Lonza, CC-3156, Walkersville, MD) suplementado con suero fetal bovino (2%) y demás factores de crecimiento celular endotelial EGM-2 (Lonza, CC-3162). Los recipientes empleados para la adhesión de dichas células fueron *flasks* (Nuncon) y placas (BD) previamente recubiertos durante al menos 30 min con una solución de fibronectina humana a una concentración de 10 µg/ml. Salvo indicación contraria, las HUVEC fueron privadas de los factores de crecimiento específicos durante al menos 1 h antes de empezar los diferentes tratamientos experimentales en medio EBM-2 suplementado al 1% con suero fetal bovino.

Las células HDMVEC se obtuvieron por medio de la casa Tebu-bio (100 05a), adquiriéndose el medio de cultivo en la misma casa (Medio CADMEC, 112K-500). Dichas células fueron mantenidas a lo largo de los pases y durante los experimentos en placas recubiertas previamente durante al menos 30 min con una solución de Fibronectina a una concentración de 10 µg/ml.

La línea celular HCMEC/D3 fue una donación de P.O. Couraud (Institut Cochin, París, Francia). Dicha línea se mantuvo en medio EndoGro-MV (Chemicon, Merck Millipore).

Las líneas celulares EA.hy926 (generosa donación del Dr. C.S.J. Edgell, Universidad de Carolina del Norte, NC), HBMEC (generosa donación del Dr. B. Weksler, Cornell

University, Ithaca, NY) y HEK293T (generosa donación de Isabel Correas) fueron mantenidas en medio DMEM suplementado con glutamina (1%) y suero fetal bovino (5%).

En los casos en que las células fueron sujetas a transfecciones o a infecciones bacterianas, ningún antibiótico fue añadido al medio. En los demás casos, se añadieron los siguientes antibióticos: HUVEC (50 µg/ml gentamicina sulfato), EA.hy926, HEK293T y HBMEC 50 U/ml de penicilina y estreptomycinina).

2.2. Clonajes, transfección de ADN y de ARN de interferencia

Los clonajes en los vectores de expresión se realizaron mediante los métodos clásicos de amplificación por PCR, corte mediante enzimas de restricción, ligación, selección y posterior secuenciación. Para la generación de la construcción RhoB-BirA-HA, se llevó a cabo la sustitución de la secuencia codificante para GFP en el plásmido pEGFP-C1 por la secuencia codificante para BirA-HA. Posteriormente, la secuencia codificante para RhoB fue amplificada a partir de una construcción RhoB 3XHA-tagged e insertada en el sitio de clonaje múltiple entre las dianas de restricción de BglIII y BamHI. Los oligonucleótidos empleados para la generación de dicha construcción quedan repertoriados en la tabla 5.

La transfección transitoria de los vectores de expresión se realizó en células endoteliales sembradas el día anterior a una confluencia de 80 %. Para ello, se crearon liposomas de ADN (1-5 µg de ADN plasmídico por cada millón de células) y Polietilenimida (PEI a 1 µg/µl, añadiendo el doble de masa de PEI que de ADN).

Los oligonucleótidos sintéticos de interferencia (siARN) fueron transfectados en las células endoteliales mediante el reactivo Oligofectamine (Invitrogen). Para ello, las células fueron sembradas en subconfluencia (75%) el día anterior en medio EBM-2 sin antibióticos. La transfección de las mismas fue realizada al día siguiente mediante la mezcla de OptiMEM+GlutaMAX (Gibco, Life Technologies, 51985-026, NY) con un volumen de 8 µl de Oligofectamin con siARN a una concentración de 100 nM. Posteriormente, se realizaron las siembras y estímulos correspondientes a cada experimento. Las células fueron procesadas 72 h después de la transfección, tiempo que corresponde a una mayor depleción de la proteína de interés.

2.3. Obtención de extractos proteicos

Los cultivos celulares fueron lisados al final de cada experimento con el fin de obtener los extractos proteicos totales correspondientes a cada condición de interés. El tampón de lisis empleado fue Laemmli 1x (Sigma), al cual se le añadieron los siguientes inhibidores de fosfatasas: 10 mM Fluoruro sódico, 0,3 µg/ml Caliculina A, 1 mM Ortovanadato sódico, 10 mM β-Glicerol-fosfato; e inhibidores de proteasas: 1mM PMSF, 10 µg/ml de Leupeptina, Aprotinina y Pepstatina. Posteriormente, estos extractos fueron hervidos a 95°C durante 5 min con el fin de desnaturalizar las proteínas.

2.4. Electroforesis de extractos proteicos (SDS-PAGE), transferencia e inmunodetección (Western blot).

Los extractos proteicos obtenidos tras la lisis celular con Laemmli se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia del detergente desnaturizante Dodecil-sulfato sódico (SDS) en condiciones reductoras gracias al sistema de electroforesis Mini-PROTEAN II (Bio-Rad). Los marcadores de peso molecular empleados consistieron en una mezcla de proteínas de pesos moleculares conocidos, comprendidos entre 10 y 250 kDa (Dual Color, BioRad). Los geles se corrieron en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 130 mM glicina y SDS 0,1%) a amperaje constante (30 mA/gel) hasta que el frente de avance llegó al borde de los mismos.

Posteriormente, las proteínas separadas por la metodología descrita en el párrafo anterior fueron transferidas desde el gel a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) en una solución de Tris-Glicina pH 8,6 y MeOH 20% mediante el sistema Mini Trans Blot (Bio-Rad). Las transferencias se llevaron a cabo durante 1 h a voltaje constante (100 V). Las membranas se bloquearon con BSA al 5% en TBS (Tris 25 mM pH 7,4, NaCl 150 mM) con detergente Tween-20 al 0,05% durante 1 h. Después, dichas membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche a 4°C y después se lavaron 3 veces durante 10 min con TBS-Tween al 0,05%. Con el fin de detectar los complejos antígeno-anticuerpo formados sobre las membranas, se volvieron a incubar con anticuerpos secundarios acoplados a la enzima peroxidasa (Horseradish Peroxidase, HRP) durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se lavaron 6 veces durante 5 min con TBS-Tween al 0,05% y se realizó la detección de proteínas mediante una reacción de quimioluminiscencia. Para ello, se emplearon los reactivos ECL (Enhanced ChemiLuminescence) de Amersham Pharmacia Biotech que actúan como sustrato de la peroxidasa de rábano. Esta reacción permite la emisión de luz que fue captada con películas fotográficas Kodak o mediante el sistema de captación Amersham Imager 600.

La cuantificación de la señal originada en los experimentos de Western blot se realizó mediante el programa ImageJ y el posterior procesamiento de las intensidades de luminiscencia con Microsoft Excel.

2.5. Ensayos de actividad de Rho-GTPasas por Pull-Down

El protocolo empleado para la determinación de la actividad de Rho GTPasas es el descrito por Ren y Schwartz (Ren y Schwartz, 2000). Las construcciones codificando para la expresión de la proteína GST conjugada con el dominio de unión a Rac/Cdc42 de la quinasa PAK (GST-PDB-PAK) y para la proteína GST conjugada con el dominio de unión a Rho del efector Rhotekin (GST-RBD-Rtk), en ambos casos bajo el control del operón *lac*, se transformaron en bacterias *E. coli* BL21. Dichas proteínas recombinantes conjugadas a GST poseen dominios de unión de efectores específicos de Rho GTPasas activas, de tal modo que GST-PBD-PAK se une específicamente a Rac1 y Cdc42 cargadas con GTP,

mientras que la proteína GST-RBD-Rtk se une a las GTPasas de la subfamilia Rho cargadas con GTP.

Con el fin de purificar estas proteínas de fusión, su expresión se indujo con IPTG durante 120 min. Después, las bacterias se lisaron en tampón PBS conteniendo 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 0,1% Tween-20 y 10 µg/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina, a 4°C. Posteriormente, se solubilizó la proteína de fusión por centrifugación y se purificó por unión a una resina de Sepharosa con glutatión. La cantidad de proteína recombinante se estimó mediante la realización de una recta patrón de concentraciones conocidas de BSA. Así, las muestras correspondientes a la recta patrón y la proteína recombinante se corrieron en un gel de acrilamida que se tiñó posteriormente con azul de Coomassie.

Para determinar la cantidad de proteína de fusión purificada, se corrió un gel de poliacrilamida en el que se cargaron, además, diferentes diluciones de albúmina de suero bovino (BSA) de concentración conocida. Así, el valor correspondiente a la proteína de fusión, se extrapoló a la curva de diluciones de BSA.

Posteriormente, al final de los diferentes experimentos, las HUVEC fueron lisadas a 4°C en tampón de lisis (50 mM Tris pH 7.4, 1% Triton X-100, 0,5 M NaCl, 10 mM MgCl₂, 10% glicerol, 1 mM EDTA pH 8, 0,5% deoxicolato sódico, 0,1% SDS, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato sódico y 10 µg/ml de leupeptina, aprotinina y pepstatina). Los lisados fueron centrifugados para separar el sobrenadante postnuclear (PNS) del resto del contenido del lisado. Una décima/centésima parte de este sobrenadante se empleó para determinar la cantidad de proteína soluble y el volumen restante se incubó con 30-50 µg de proteínas recombinantes GST-PBD-PAK o GST-RBD-RTK unidas a 20 µl de resina Sepharosa con glutatión durante 35 min a 4°C en noria. Posteriormente, la resina se lavó por centrifugación a baja velocidad a 4°C en el propio tampón de lisis y las proteínas unidas a ella se eluyeron con la adición de tampón de carga Laemmli 1x, centrifugando 5 min a 12000 rpm y desnaturizando las muestras 5 min a 95°C. Finalmente, las proteínas se separaron por SDS-PAGE y se detectaron por Western blot con anticuerpos específicos.

2.6. Ensayos de inmunoprecipitación

Con el fin de inmunoprecipitar y co-inmunoprecipitar las proteínas de interés, se crecieron células endoteliales en placas de 100 mm de diámetro a confluencia y se estimularon según las condiciones deseadas. Posteriormente, se lisaron las células en 400 µl de tampón de lisis (TBS 1x, 10 mM EDTA, 1% Tritón, 0,3 µg/ml Caliculina A, 1 mM PMSF, 10 µg/ml de Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina, 1 mM Ortovanadato sódico, 10 mM β-Glicerolfosfato y 10 mM Fluoruro Sódico). Se pasaron los lisados 5 veces por una aguja de 0,6 mm para disgregar los agregados celulares y se centrifugaron 5 min a 12000 rpm. Del sobrenadante resultante, 40 µl fueron diluidos con un volumen idéntico de Laemmli 2x para determinar las proteínas presentes en el extracto total y el resto fue incubado durante 2 h en noria a 4°C con 30 µl de Proteína A/G previamente incubada durante 3 h con los anticuerpos de ratón/conejo con los que queremos inmunoprecipitar las proteínas de interés. Estos últimos tubos fueron centrifugados 1 min a 800 rpm y lavados 5 veces en

buffer de lisis antes de añadir 30 µl de Laemmli 2x, para luego hervirlos 5 min a 95°C y cargarlos en geles de poliacrilamida para revelar las proteínas de interés por western blot con anticuerpos específicos.

2.7. Ensayos de biotinilación de proteínas de superficie celular

Con el fin de marcar las proteínas presentes en la superficie de las monocapas endoteliales, se llevaron a cabo experimentos de biotinilación mediante Sulfo-NHS Biotin (Thermo Fischer Scientific). Esta molécula es capaz de unirse covalentemente a los aminoácidos lisina accesibles en las proteínas celulares, y no puede atravesar las membranas celulares. Cuando las células se incuban en frío con este derivado de biotina para detener el tráfico de membrana, se biotinilan sólo las proteínas de superficie. Para ello, HUVEC fueron crecidas hasta confluencia en placas de 60 mm de diámetro y estimuladas según las condiciones de cada experimento. Se lavaron 2 veces con PBS Completo a 4°C y se incubaron con una dilución de biotina 1:2000 v/v en PBS completo a 4°C durante 30 min. Después, se volvieron a lavar una vez con PBS completo a 4°C y se bloquearon con DMEM 10 % FBS durante 15 min a 4°C. Se volvieron a lavar una vez con PBS completo frío y se lisaron en 400 µl de tampón de lisis (TBS 1x, 10 mM EDTA, 1% Tritón, 0,3 µg/ml Caliculina A, 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinina, Leupeptina y Pepstatina, 1 mM Ortovanadato sódico, 10 mM β-Glicerol-fosfato y 10 mM Fluoruro Sódico con la ayuda de raspadores, conservándose el lisado obtenido como extracto total. Dicho extracto se disgregó pasándolo 5 veces por una aguja de 0,6 mm de diámetro y se centrifugó 5 min a 14000 rpm. Parte del sobrenadante obtenido (40 µl) se diluyó en el mismo volumen de Laemmli 2x y el resto fue transferido a un tubo con 20 µl de Sepharosa para realizar un pre-aclarado durante 1 h a 4°C en noria. Posteriormente, el lisado pre-aclarado fue centrifugado y re-incubado con 20 µl de Neutravidina-agarosa durante 2 h en noria a 4°C. Tras ello, se lavó 3 veces con Buffer de lisis, se le añadió el mismo volumen de Laemmli 2x que de resina, se hirvió 5 min a 95°C y se cargó en un gel de poliacrilamida para después detectar las proteínas de interés por Western blot con anticuerpos específicos.

2.8. Ensayos de biotinilación dependiente de proximidad (BioID)

Con el fin de caracterizar la asociación transitoria entre RhoB y Rac1, se siguió el protocolo descrito por Roux en 2012 (Roux et al., 2012). Para ello, se generaron dos vectores de expresión codificando para BirA-RhoB y GFP-Rac1 y se transfectaron en HEK293 con PEI 48 h antes del ensayo de BioID. Las células se incubaron con biotina 50 µM durante 24 h, se lisaron y se sometieron a ensayos de Pull-Down para proteínas biotiniladas con Neutravidina-agarosa. Alternativamente, las células fueron lisadas en un tampón Tris-HCl 25 mM, pH 7.4, Tritón 1 %, 150 mM NaCl y EDTA 2 mM con inhibidores de proteasas durante una h a 4°C. Después de pre-aclarar el sobrenadante postnuclear durante 1 h con una inmunoglobulina control conjugada a la proteína G-Sepharosa, GFP-Rac1 fue inmunoprecipitada con un anticuerpo específico anti-GFP conjugado a la proteína G-Sepharosa durante 12 h. En paralelo, un control de inmunoprecipitación con una

inmunoglobulina del mismo isotipo fue realizada. Después de varios lavados con tampón de lisis, los inmunoprecipitados fueron analizados por western blot con anticuerpo anti-Rac1 y con estreptavidina-peroxidasa.

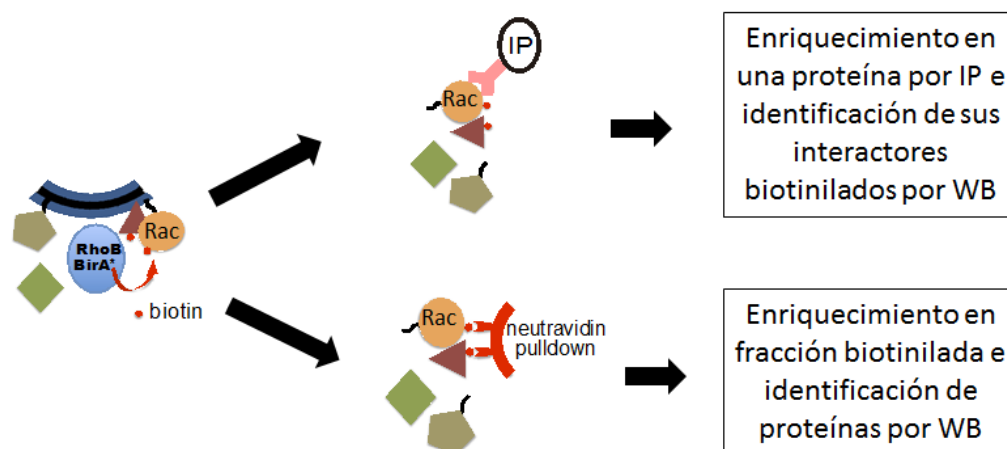


Ilustración 9: Doble aproximación para la identificación de la interacción entre RhoB y Rac1. Primero, se indujo la biotinilación de los interactores de RhoB mediante la transfección de una construcción RhoB-BirA en células HEK293. Después, se monitorizó el grado de biotinilación de Rac1 de dos maneras diferentes. Por un lado, se inmunoprecipitó Rac1 y se reveló su grado de biotinilación con estreptavidina-peroxidasa. Por otro, se realizó un *pull-down* con neutravidina-agarosa y se revelaron las proteínas biotiniladas con un anticuerpo anti-Rac1 para ver si la proteína aparecía en mayor medida por haberse incrementado su grado de biotinilación.

2.9. Inmunofluorescencia y microscopía confocal

Con el fin de observar la localización de las proteínas de interés en las células endoteliales, estas últimas fueron crecidas sobre cubreobjetos de vidrio en placas de pocillos de fondo plano (Costar Corp., Cambridge, MA), estimuladas según los requerimientos de cada experimento y fijadas a los tiempos adecuados con una solución de formalina (Formaldehído al 37 %; Sigma-Aldrich) al 10 % (v/v) en PBS durante 20 min a temperatura ambiente. El exceso de formaldehído se bloqueó incubando 5 min con una solución de TBS-Glicina 10 mM.

Posteriormente, las células fijadas se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,2 % (v/v) en TBS a 4°C y se bloquearon con una solución de BSA al 3% en TBS durante 20 min a temperatura ambiente. A continuación, los cubreobjetos se incubaron 30 min a 37°C con los anticuerpos primarios y secundarios (acoplados a fluoróforos, al igual que la faloidina) correspondientes a las diluciones adecuadas en solución de bloqueo de manera secuencial. Lavados con TBS fueron intercalados entre cada incubación. Finalmente, se prepararon las muestras mediante el empleo de medio de montaje Fluoromount (Southern Biotechnology Associates Inc., Birmingham, AL).

Las preparaciones se analizaron en microscopio confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido de Zeiss modelo Axiovert 200 M. Las imágenes obtenidas se trataron con los programas LSM 5 Image Browser, Adobe Illustrator 10 e ImageJ.

Para la cuantificación de la intensidad de fluorescencia, se empleó el programa ImageJ:

- La determinación de huecos intercelulares (*Intercellular gaps*) se realizó mediante las herramientas *Threshold* (la cual permite discriminar entre distintas intensidades de señal, por lo que podemos seleccionar únicamente las zonas carentes de células según la tinción de F-actina) y *analyze particles* (la cual permite cuantificar las áreas seleccionadas).
- Por otro lado, la determinación de intensidad de fluorescencia a nivel de las uniones interendoteliales se realizó cuantificando la intensidad de fluorescencia del marcador elegido (VE-cadherina total, o VE-cadherina de superficie) en la totalidad de la célula, la intensidad de la fluorescencia de VE-cadherina en el citoplasma, restando el segundo valor al anterior y dividiendo el valor obtenido por el área correspondiente. Así, se obtiene un cociente de intensidad de VE-cadherina en membrana/área que podrá ser comparado en las diferentes condiciones estudiadas.

2.10. Ensayos de marcaje de VE-cadherina en superficie celular.

Para marcar únicamente la población de VE-cadherina de superficie *in vivo* y poder visualizarla después por inmunofluorescencia, se empleó el anticuerpo anti-VE-Cadherin BV6. Las células, sembradas sobre cubreobjetos, se incubaron en los tiempos de interés de cada experimento a 4°C durante 1 h con una dilución 1:50 de dicho anticuerpo en medio completo de HUVEC 3% BSA, HEPES 10 mM. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con este mismo medio y se fijaron las células con PFA al 4% para ser procesadas por inmunofluorescencia.

2.11. Videomicroscopía confocal

Con el objetivo de visualizar el tráfico intracelular de la proteína Rac1, se transfectaron HUVEC previamente sembradas en placas de fondo de vidrio con una construcción Rac1-cherry durante 24 h, se estimularon TNF durante 7 h y con Trombina durante 2 h. El periodo de estimulación y recuperación correspondiente a la adición de Trombina fue monitorizado secuencialmente a intervalos de 5 min con un microscopio de barrido láser confocal y multifotón LSM710 y LSM510 acoplados a un microscopio invertido AxioObserver y uno vertical AxioImager M1 (Zeiss), respectivamente.

2.12. Microscopía de superresolución

Con el fin de obtener imágenes de mayor resolución que las de microscopía confocal, se recurrió a la microscopía de emisión y depleción estimulada (STED). Se empleó un microscopio TCS SP5 II STED de Leica (Leica, Alemania), usando el láser STED para modificar la fluorescencia emitida por los fluoróforos correspondientes a las longitudes de

onda de 488 y 555 nm. La excitación se llevó a cabo con un láser de diodo pulsado y la desexcitación con un láser MaiTai fs sintonizable.

2.13. Inmunohistoquímica

El análisis inmunohistoquímico de muestras de tejidos humanos se llevó a cabo en colaboración con el Hospital Universitario de Salamanca. El comité de ética del hospital aprobó los análisis. Además de las biopsias correspondientes a las enfermedades que se indican, los controles provienen de donantes sanos o de tejido de hígado o intestino no afectado y retirado de pacientes con carcinoma.

Se emplearon secciones de tejido de 4 mm de grosor fijadas con formalina y embebidas en parafina. Éstas fueron desparafinadas en xileno y rehidratadas en una batería de soluciones de alcohol de porcentaje decreciente. Después de inhibir la peroxidasa endógena (H_2O_2 al 3 % v/v durante 10 min y desenmascarar los epítomos (hirviendo con tampón citrato 10 mM, pH 6 durante 15 min), se bloquearon las muestras con suero (de la misma especie animal que la del anticuerpo secundario) al 2.5 % en PBS 1x durante 30 min. Posteriormente, se incubaron las muestras con el anticuerpo primario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda, para luego lavarlas con PBS e incubarlas con el anticuerpo biotinilado correspondiente durante 30 min. Tras volver a lavar, se incubó el complejo estreptavidina-biotina-peroxidasa (VECTASTAIN ABC Reagent, Vector Laboratories) durante otros 30 min y por último, las proteínas marcadas se visualizaron utilizando DAB (Dako). La contratinción se realizó con hematoxilina de Mayer. En cada experimento se realizó un control negativo para comprobar la especificidad de los anticuerpos, incubando las muestras con anticuerpo secundario únicamente. En dicho caso, no se detectó ninguna tinción. La inmunohistoquímica también se realizó en un sistema completamente automatizado (Bond III, Leica).

2.14. Ensayos de medición de resistencia transendotelial

La resistencia transendotelial (TEER) de monocapas endoteliales fue monitorizada mediante un sistema sensitivo de impedancia eléctrica célula-sustrato (ECIS 1600R, Applied Biophysics, Troy, NY). Este sistema permite medir cambios en los valores de permeabilidad endotelial en tiempo real. Las células endoteliales se siembran en pocillos cuyo fondo está recubierto por electrodos de oro. El dispositivo emite una corriente eléctrica a través de éstos, la cual encuentra una determinada resistencia para atravesar la monocapa de células. A mayor resistencia, menor permeabilidad de la monocapa, y viceversa.

Para realizar estos experimentos, las células endoteliales previamente transfectadas con los siARN correspondientes fueron sembradas en confluencia a una densidad de 200.000 células/cm² sobre placas de ECIS de 8 pocillos y 10 electrodos por pocillo (8WE10 arrays; IBIDI, Martinsried, Germany) previamente recubiertas con una solución de Cisteína 10 mM en agua estéril durante 30 min y posteriormente recubiertas con una solución de 200

$\mu\text{g/ml}$ de fibronectina diluida en agua destilada estéril durante un mínimo de 2 h. Tras 48 h, el medio de cultivo de las células fue reemplazado por medio sin factores de crecimiento al 1 % de suero y las placas conectadas al dispositivo. Una vez la curva de permeabilidad estabilizada, las células fueron tratadas con los diferentes estímulos a los tiempos adecuados (TNF, trombina, depleción de calcio por adición de PBS...). La permeabilidad fue monitorizada, como mínimo, hasta que los controles recuperaron valores de resistencia similares a los iniciales.

Todos los datos fueron normalizados antes de proceder a las cuantificaciones. El porcentaje de disminución y recuperación de la TEER se calculó respecto a los valores máximos de permeabilidad, teniendo en cuenta que el valor de un pocillo carente de células corresponde a 300 ohm.

2.15. Ensayo de depleción de calcio (*Calcium Switch*)

Con el objetivo de provocar una internalización masiva de VE-cadherina, realizamos ensayos de depleción de calcio. Éstos consistieron en el reemplazo del medio de cultivo por PBS 1x durante un periodo de 15 min. La ausencia de dicho catión debilita la interacción homofílica entre cadherinas, lo cual provoca un desensamblaje de los complejos de uniones adherentes.

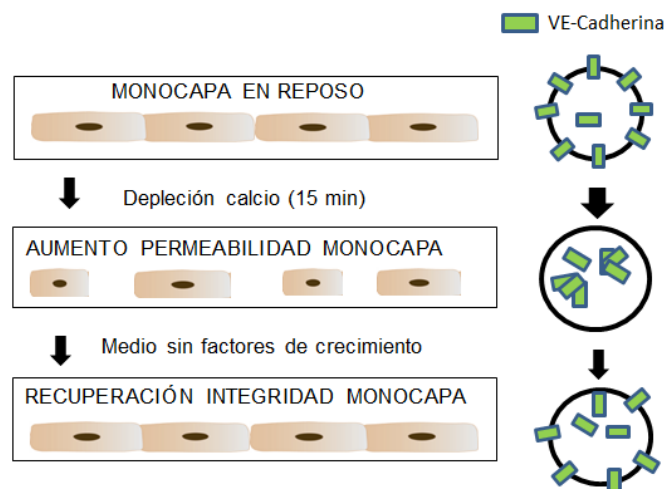


Ilustración 10: Experimento de depleción de calcio por adición de PBS (*Calcium Switch*). HUVEC fueron sembradas a confluencia y estimuladas según las condiciones deseadas. El medio de cultivo pobre en factores de crecimiento fue reemplazado por PBS durante 15 min (depleción de calcio), el cual fue reemplazado de nuevo por medio de cultivo pobre en factores de crecimiento. A la derecha, se representa esquemáticamente la posible localización de VE-cadherina en la célula durante las diferentes etapas del proceso.

2.16. Identificación de nuevas proteínas reguladas por TNF en células endoteliales.

Con el objetivo de detectar nuevas proteínas endoteliales humanas cuya expresión y/o localización se viera modulada por la estimulación con TNF, se crecieron HUVEC a

confluencia y se estimularon con TNF a 0, 4 y 24 h. Posteriormente, se biotinilaron las células en su superficie con Sulfo-NHS-Biotina como ya se ha descrito anteriormente, se lisaron y sometieron a una purificación por pull-down con estreptavidina-agarosa. Las proteínas cuya expresión en superficie aumentaba o disminuía en respuesta a TNF fueron detectadas por inmunoblot con estreptavidina-peroxidasa para posteriormente someterlas a un análisis proteómico mediante espectrometría de masas LC MS/MS.

Para las proteínas cuya expresión en superficie aumentaba en respuesta a TNF, se realizó un ensayo de PCR cuantitativa con el fin de comprobar si dicha regulación se operaba a nivel transcripcional. El protocolo figura en el apartado siguiente (2.17).

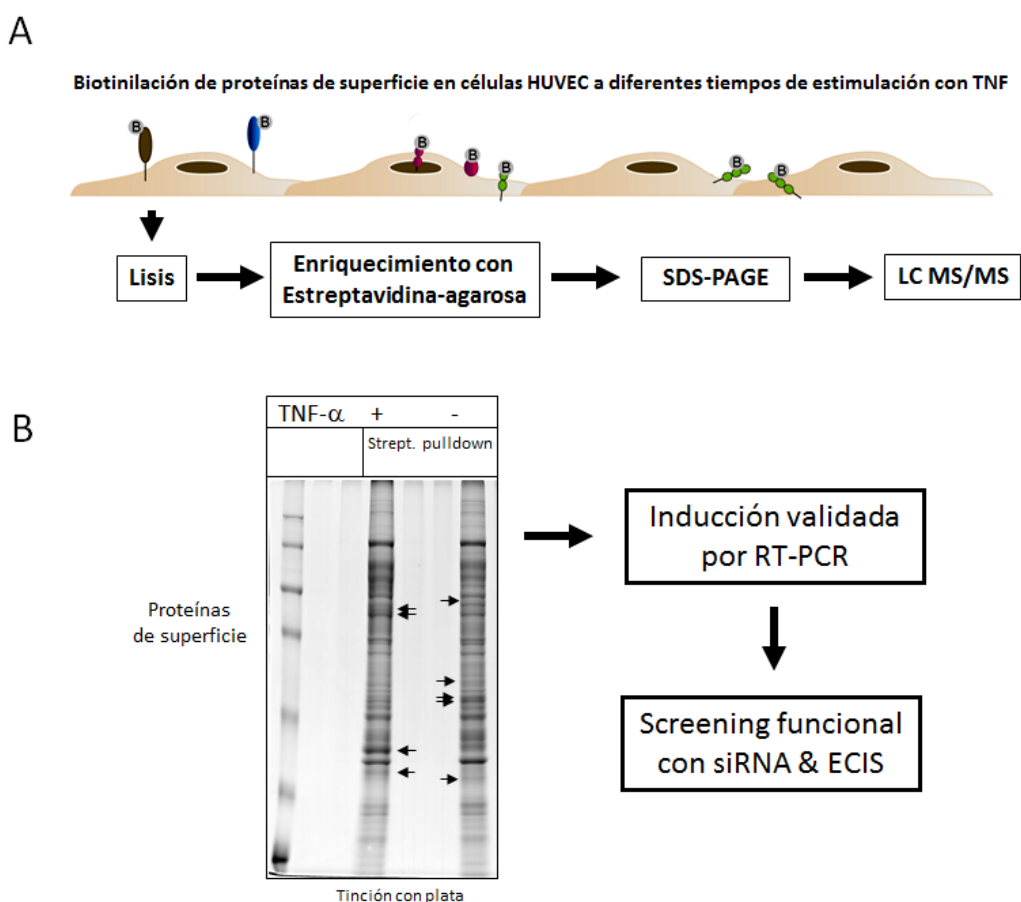


Ilustración 11: (A) Experimento que permite identificar proteínas cuya expresión en superficie se ve modulada por TNF. HUVEC fueron sembradas a confluencia, estimuladas con TNF a 0, 4 y 24 h, lisadas, purificadas por Pull-Down con Estreptavidina-agarosa, corridas en geles SDS-PAGE y las proteínas obtenidas analizadas por análisis proteómico con espectrometría de masas LC MS/MS. (B) Gel revelado con tinción de plata correspondiente a las proteínas biotiniladas que aparecen en mayor o menor medida según se estimulan las células o no con TNF. La inducción transcripcional de las proteínas identificadas fue validada por RT-PCR. Más adelante, se realizaron ensayos funcionales de silenciamiento de las proteínas de interés mediante el sistema ECIS.

2.17. Screening RT-PCR GTPasas y proteínas reguladas por TNF.

Con el fin de caracterizar los niveles de mRNA de diferentes GTPasas de la subfamilia RhoA, así como aquellas cuya expresión en superficie celular se veía incrementada en

respuesta a TNF, se realizaron RT-PCR en muestras de mRNA purificado con Trizol de cultivos de HUVEC estimuladas con TNF a 0, 4 y 24 h.

Un microgramo de ARN de HUVEC fue sometido a transcripción reversa con el kit High-capacity RNA-cDNA (Applied Biosystems). La RT-qPCR fue realizada a partir del cADN resultante en un termociclador CFX 384 (BioRad) utilizando el SsoFast EvaGreen Supermix (BioRad) y los oligos izquierdo y derecho previamente diseñados con el software Profinder de Roche (ver apartado 1.4.1). En paralelo, se realizó también una qPCR para los genes de referencia β -actina y GAPDH para así poder normalizar los datos correspondientes a cada punto de estimulación. Las muestras fueron procesadas por triplicado en paralelo con controles sin transcripción reversa para todas las dianas que no mostraron una amplificación detectable. A menos que se indique lo contrario, los valores de los ciclos de cuantificación (C_q) estuvieron dentro del rango 20-24, lo cual indica la presencia de niveles medio-altos de transcritos. La cuantificación relativa se llevó a cabo con el software GenEx teniendo en cuenta para las correcciones la eficiencia de cada pareja de oligos, los triplicados y la contaminación con DNA genómico, que fue despreciable. La cuantificación relativa ($2^{-\Delta C_q}$) se realizó con respecto a la expresión a tiempo 0 de estimulación con TNF. Posteriormente, estos valores fueron normalizados de nuevo frente a la media de los valores de los genes de referencia. Para ello, la estabilidad de los genes candidatos de referencia se evaluó con los algoritmos geNorm y Normfinder de GenEx. Una combinación de los dos más estables fue elegida para normalizar los resultados. Todo el proceso fue realizado con la ayuda del servicio de genómica del CBMSO.

2.18. Ensayos de infección por *Neisseria meningitidis*

Con el fin de infectar monocapas endoteliales con *Neisseria meningitidis* (cepa 2C43), se sembró dicha bacteria en placas de agar en medio GCB el día anterior. El día de la infección, se realizó un pre-cultivo que consistió en la inoculación de 10 colonias aisladas por ml de medio de cultivo de células endoteliales sin factores de crecimiento. Al cabo de 2 h, la densidad óptica de dicho pre-cultivo se llevó a 0,1 y 200 μ l de esta nueva dilución fueron añadidos a cada pocillo de p24 a infectar. Después de 30 min de adhesión de la bacteria al endotelio, se realizaron 3 lavados con medio de cultivo sin factores de crecimiento y se esperó el tiempo de infección deseado hasta fijar (IF) o lisar las células (WB).

2.19. Análisis estadístico

Las medias aritméticas (PROMEDIO), el error estándar (*Standard Error of the Mean*, SEM) y las significaciones estadísticas mediante la t de Student fueron calculados con el programa Microsoft Excel.

RESULTADOS

1. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA BARRERA ENDOTELIAL DURANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA INDEPENDIENTES DE LAS UNIONES INTERCELULARES

En nuestro laboratorio, nos concentramos principalmente en el estudio de los efectos del TNF sobre el endotelio vascular humano (Marcos-Ramiro et al., 2014). Combinando técnicas de proteómica, inmunodetección y PCR cuantitativa, hemos identificado varias proteínas candidatas a regular la función de barrera endotelial.

Una de estas proteínas es la GTPasa RhoB, cuya expresión aumenta en respuesta a la estimulación con TNF en HUVECs y cuya actividad se incrementa en respuesta a agentes proinflamatorios agudos como la trombina. RhoB pertenece a la familia de las Rho GTPasas, que son los reguladores maestros de la actina filamentosa. Puesto que esta red citoesquelética es fundamental para la remodelación morfológica de las células endoteliales en respuesta a citoquinas inflamatorias, nos centramos en el estudio de esta proteína. En la anterior tesis doctoral, se demostró en células endoteliales de venas grandes, HUVECs, previamente tratadas con TNF, que la actividad de RhoB retiene a la GTPasa Rac1 en un compartimento intercelular, con lo que se produce un retraso en la formación de protrusiones de membrana. Éste, a su vez, produce una demora en la recuperación de la función de barrera tras una contracción aguda, debilitando la integridad de la monocapa endotelial en un contexto inflamatorio, a pesar de que la activación de RhoB no tiene un efecto aparente sobre las uniones célula-célula (Marcos-Ramiro, tesis doctoral, 2015; Marcos-Ramiro et al., 2016). Decidimos como primer objetivo profundizar en la investigación de esta proteína analizando primero si los cambios de expresión de esta GTPasa en respuesta a TNF son generales para toda la familia Rho; segundo, si RhoB juega un papel importante en el tipo endotelial más relevante en la respuesta inflamatoria fisiológica, el endotelio de la microvasculatura, y tercero, si el efecto de RhoB sobre la función de Rac1 ocurre únicamente en el proceso de extensión de protrusiones de membrana o también durante la contracción y si éste implica algún tipo de interacción transitoria entre ambas proteínas, mediante la realización de ensayos bioquímicos de proximidad.

1.1. TNF aumenta la expresión de RhoB y Rnd1 en células endoteliales humanas.

Con el fin de verificar si RhoB era la única GTPasa de la familia Rho cuya expresión aumentaba significativamente en respuesta a la estimulación con TNF (Marcos-Ramiro et al., 2016), se llevó a cabo un *screening* por PCR cuantitativa en HUVEC. En éste, observamos que las GTPasas RhoB y Rnd1 aumentan sus niveles significativamente en respuesta a TNF (Fig. 1). Más concretamente, RhoB aumenta sus niveles del orden de cuatro veces después de 4 h de estimulación con TNF, manteniéndose más elevados respecto al control tras 24 h de estimulación, tiempo máximo testado en las cinéticas

realizadas. Por otro lado, los niveles de la GTPasa Rnd1 aumentan del orden de 20 veces después de 4 h de estimulación con TNF y disminuyen de nuevo tras 24 h de estimulación. Las demás GTPasas no se indujeron significativamente. En el caso de RhoH, no se detectaron transcritos. Por tanto, la mayoría de los miembros de la familia Rho no se regulan transcripcionalmente en respuesta a TNF.

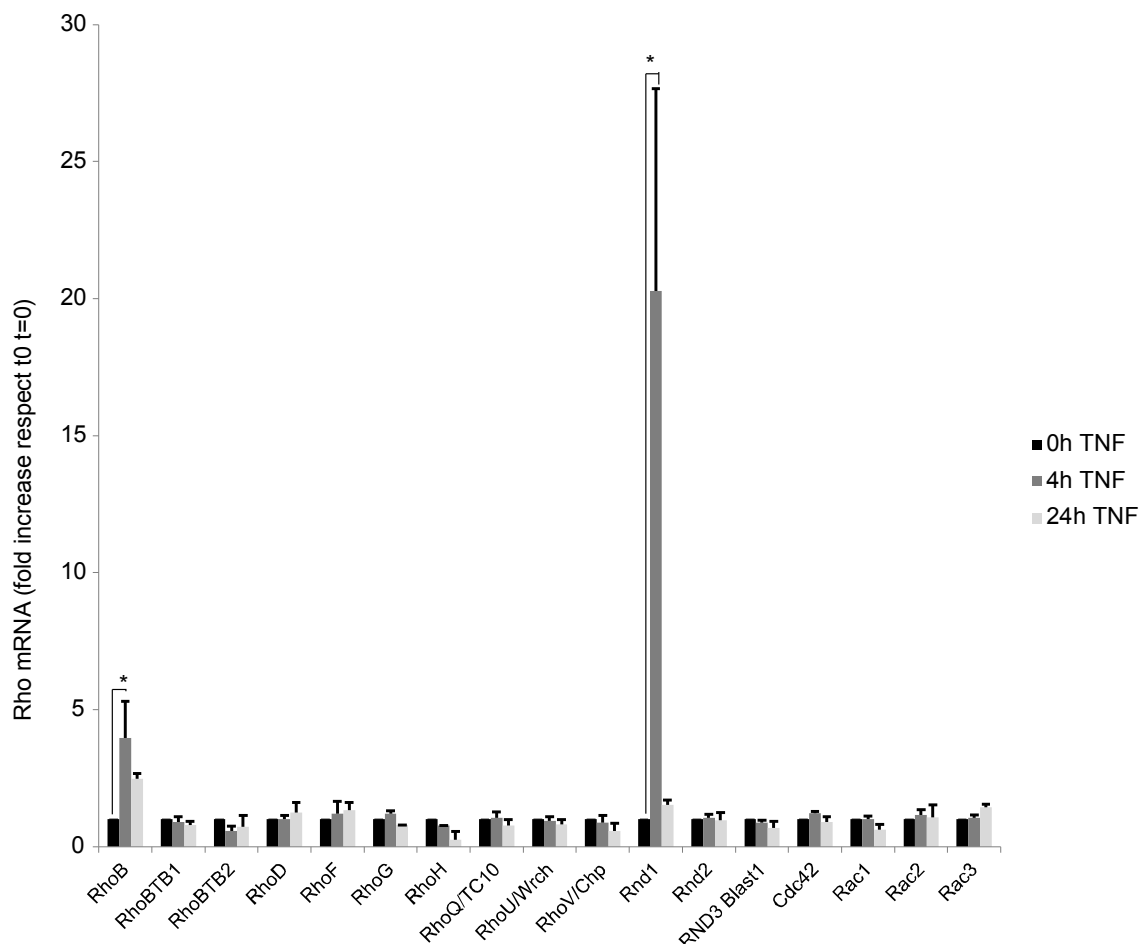


Figura 1. TNF aumenta la expresión de las GTPasas RhoB y Rnd1. HUVEC se cultivaron con niveles reducidos de nutrientes durante 12 h y fueron estimuladas con TNF a 0, 4 y 24 h, lisadas con trizol con el fin de aislar su ARN mensajero, el cual fue analizado por PCR cuantitativa con los pares de oligos correspondientes a cada GTPasa. Los resultados fueron normalizados con respecto a los ARN mensajeros de los genes de referencia (β -actina y GAPDH). El gráfico representa la media y el error estándar medio (SEM) de 3 experimentos independientes. * p-valor <0.05.

1.2. RhoB se expresa preferentemente en vénulas post-capilares

RhoB no sólo aumenta su expresión in vitro en HUVEC en respuesta a TNF, si no que también se incrementa en los vasos sanguíneos de tejidos con enfermedades inflamatorias crónicas, como la enfermedad de Crohn (Marcos-Ramiro, 2016). Un análisis detallado de muestras de este tejido mostró una expresión preferente en las lesiones que aparecen en partes del intestino cuando se manifiesta esta enfermedad. Estas lesiones constituyen hiperplasias donde ha ocurrido un daño tisular más acentuado, con aumento de rotura de vasos y procesos protrombóticos. Como muestran las figuras 2A y B, se observa una tinción intensa de RhoB en estas regiones (Figs. 2A y B, cuadro i, Figs. 2C y D) en

contraste con otras zonas del tejido en las que los vasos no expresan RhoB (Figs. 2A y B, cuadro ii, Figs. 2E y F). Con el objetivo de determinar en qué tipos de vasos se expresa preferentemente RhoB en este tejido intestinal, realizamos tinciones inmunohistoquímicas para marcadores de vasos pequeños (SMA, *Smooth Muscle Actin*) y grandes (Proteoglicano NG2) en cortes consecutivos de tejido en las regiones en las que previamente se había observado expresión de RhoB. Observamos que los vasos positivos para RhoB (Figs. 2B-región i, D y G) presentan niveles elevados del marcador vascular actina de músculo liso (SMA) (Fig. 2H), pero sin embargo niveles bajos de proteoglicanos NG2, el cual es un marcador de arteriolas y capilares (Fig. 2I) (Murfee et al., 2005). Estos datos sugieren que RhoB se expresa preferentemente en vasos pequeños como las vénulas post-capilares, las cuales poseen una función de barrera limitada y donde ocurren muchos de los eventos de alteración de barrera endotelial necesarios para facilitar la extravasación de células del sistema inmunitario hacia el foco inflamatorio.

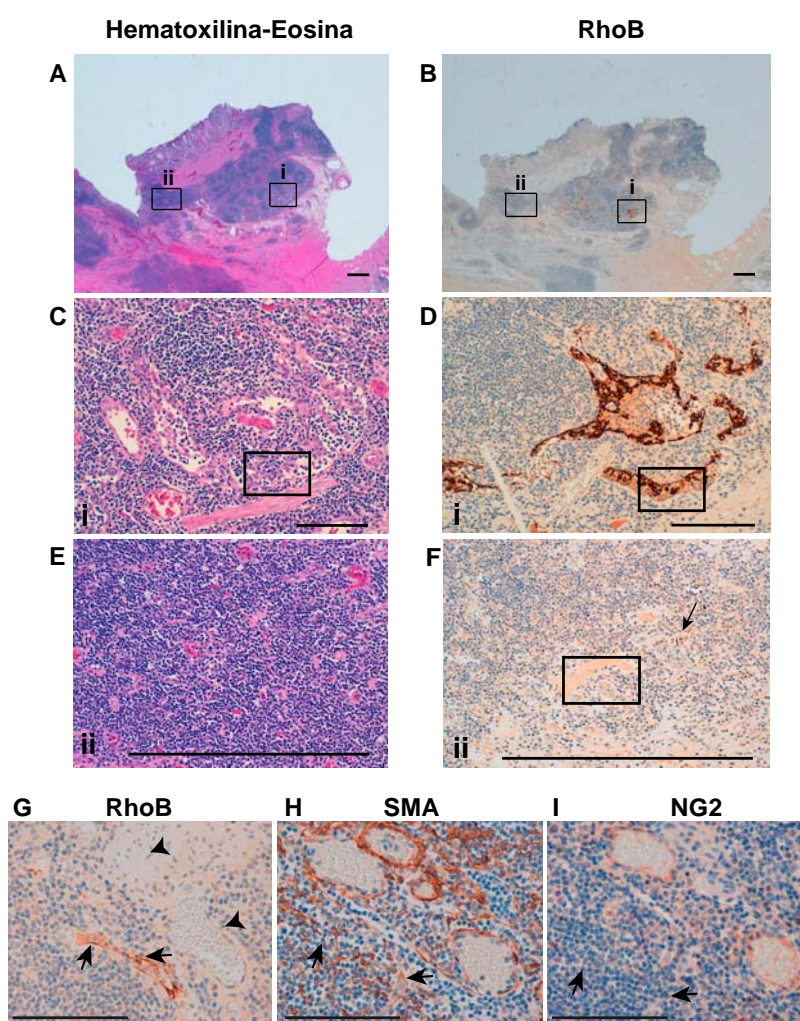


Figura 2. RhoB se expresa principalmente en vénulas post-capilares en muestras de intestino delgado de pacientes con enfermedad de Crohn. Se muestran secciones consecutivas de tejido intestinal a diferentes aumentos teñidas con hematoxilina-eosina y con un anticuerpo específico de RhoB (A-F). En ellas, se observa que RhoB se expresa en ciertas regiones que presentan lesiones (B, región i positiva para RhoB, región ii negativa para RhoB, ampliaciones C-F). En una serie de secciones positivas para RhoB, se observa que RhoB (G) se expresa principalmente en pequeños vasos que presentan una tinción positiva para la actina de músculo liso SMA (H) y negativa para el proteoglicano NG2 (I). Barra de escala 100 μ m.

1.3. RhoB se expresa en células microvasculares dermales y aumenta su expresión en respuesta a TNF

Si RhoB se expresa en la microvasculatura *in vivo* en un contexto inflamatorio, quisimos estudiar esta proteína en células microvasculares *in vitro*. Para ello, realizamos cinéticas de estimulación por TNF a 0, 4, 7 y 24 h en células microvasculares dermales humanas HDMVEC. Observamos que las GTPasas RhoA, RhoB y RhoC se expresan en dichas células, aumentando únicamente los niveles de RhoB, y no los de RhoA o RhoC, a 4 y 7 h de estimulación, siendo este último tiempo el de máxima expresión, tanto por inmunoblot (Fig. 3A) como por inmunofluorescencia (Fig. 3B). Estos resultados son acordes con los ya descritos en células de vasos grandes (HUVEC) por Marcos-Ramiro en su tesis doctoral (2015).

Además, con el fin de realizar experimentos de silenciamiento de proteínas Rho más adelante, se transfectaron HDMVEC con diferentes ARN de interferencia para RhoA, RhoB y RhoC, observándose una notable reducción de los niveles de dichas proteínas en este tipo celular primario (Fig. 3C y Fig. 3D).

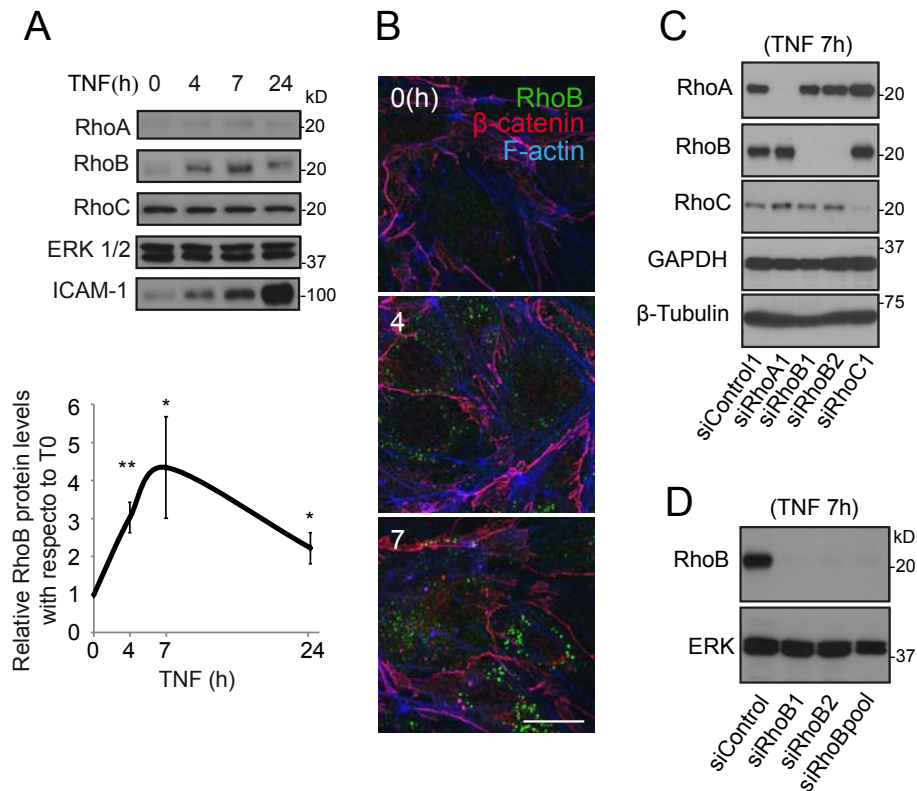


Figura 3. La expresión de RhoB se induce en células microvasculares dermales humanas (HDMVEC) en respuesta a TNF. (A) HDMVEC fueron cultivadas en medio con niveles reducidos de nutrientes durante 24 h, estimuladas con TNF durante 0, 4, 7 y 24 h y lisadas para monitorizar las proteínas indicadas por inmunoblot. La cuantificación corresponde a 3 experimentos independientes. * p-valor <0.05; ** p-valor <0.01. (B) HDMVEC fueron cultivadas en medio con niveles reducidos de nutrientes durante 24 h, estimuladas con TNF durante 0, 4 y 7 h y fijadas para marcar las proteínas indicadas por inmunofluorescencia. Barra de escala 20 µm. (C y D) HDMVEC fueron silenciadas para RhoA, RhoB o RhoC empleando los ARN de interferencia indicados, estimuladas con TNF durante 7 h en medio con niveles reducidos de nutrientes y lisadas para la inmunodetección de dichas proteínas.

1.4. RhoB regula la recuperación de la función de barrera tras la contracción inducida por trombina en HDMVEC previamente estimuladas con TNF.

Con el fin de estudiar la contribución de cada GTPasa en la contracción aguda que ocurre en un ambiente inflamatorio en células microvasculares dermales HDMVEC, se silenciaron RhoA, RhoB y RhoC y se empleó el sistema ECIS para monitorizar la función de barrera de dichas células en tiempo real. Las células fueron pre-tratadas con TNF durante 7 h. En ese momento, se realizó una estimulación con el mediador protrombótico e inflamatorio trombina, lo que provocó una drástica e inmediata disminución de la resistencia trans-endotelial. Este brusco aumento de la permeabilidad endotelial se produjo hasta un punto máximo de contracción que se alcanzó a los 40 min de estimulación. Después de ello, las células tendieron a recuperarse de manera progresiva hasta que la resistencia trans-endotelial retornó a los valores iniciales hacia las 3 h post-estimulación.

Observamos que las HDMVEC tratadas con cualquiera de los ARN de interferencia frente a RhoA, RhoB y RhoC indujeron una reducción de la contracción inicial en respuesta a trombina, siendo la reducción mayor para las células silenciadas para RhoB y RhoC. Esto contrasta con los datos obtenidos para células endoteliales de vasos grandes, en los que la contracción inicial apenas se ve afectada por el silenciamiento de RhoA y RhoC, sugiriendo que estas tres Rho GTPasas desempeñan funciones menos redundantes durante los fenómenos de contracción aguda en la microvasculatura (Marcos-Ramiro, tesis doctoral, 2015; Marcos-Ramiro et al., 2016). Sin embargo, las células deplecionadas para RhoB usando un siARN individual o un pool de 4 siARNs distintos exhibieron una disminución de la contracción máxima a 1 h y además un acortamiento significativo del tiempo de recuperación de los valores de resistencia, aunque éstos quedaron siempre por debajo de los iniciales: mientras que las células silenciadas para RhoA o RhoC alcanzan niveles de resistencia de 0.6 a las 4 h post-estimulación, las células silenciadas para RhoB consiguen llegar a valores de 0.8 en ese mismo tiempo (Fig. 4A). De nuevo, el efecto del silenciamiento génico de RhoC sobre la recuperación fue también detectable, aunque claramente menor en comparación con el causado por la reducción de RhoB.

Para confirmar el efecto de RhoB sobre la recuperación de la función de barrera microvascular tras una contracción aguda, las HDMVEC fueron silenciadas para Rho B en células sembradas sobre cubreobjetos, las cuales fueron fijadas 2,5 h después de la estimulación con trombina, es decir, en el periodo de recuperación (Fig. 4B). Así, se observó que las células silenciadas para RhoB con un ARN de interferencia individual o un pool de 4 siARNs diferentes presentan una mayor intensidad de β -Catenina en sus uniones adherentes respecto a las células control, lo cual sugiere que la integridad de la monocapa es mayor que en las células transfectadas con siARN control.

En conjunto, estos datos sugieren que RhoB regula negativamente la reformación de la barrera endotelial después de la contracción aguda mediada por trombina en HDMVEC previamente estimuladas con TNF. El papel de RhoA y RhoC en este proceso de contracción aguda es, a diferencia de lo observado en HUVEC, significativo también, aunque claramente menor que el de RhoB.

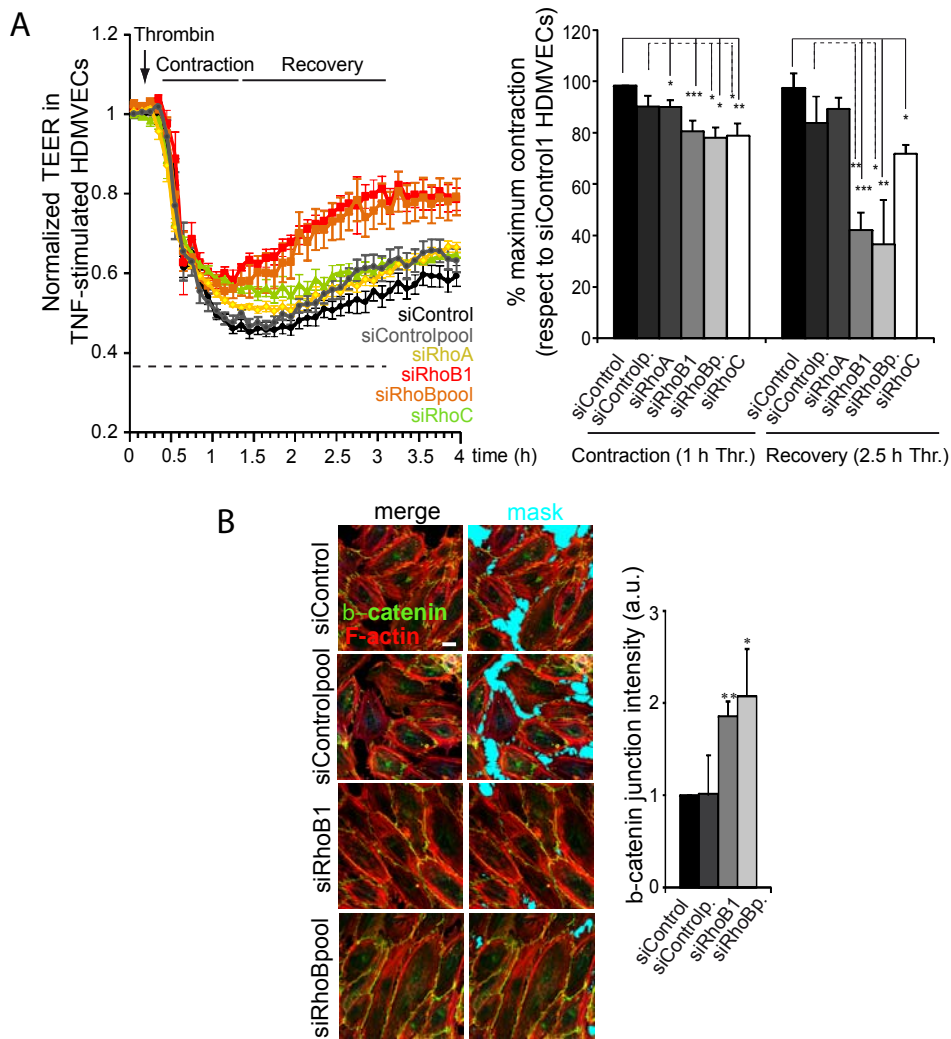


Figura 4. RhoB regula negativamente la recuperación de la barrera endotelial tras la contracción inducida por trombina en células endoteliales microvasculares humanas en un contexto inflamatorio. (A) Resistencia eléctrica trans-endotelial (TEER) de monocapas de HDMVEC durante la contracción inducida por trombina en células previamente transfectadas con ARN de interferencia de RhoA, RhoB y RhoC y pre-estimuladas con TNF durante 7 h. Se indica el promedio \pm SEM de al menos tres experimentos independientes. La gráfica muestra la cuantificación del porcentaje de máxima contracción con respecto a las células tratadas con el siControl en los tiempos indicados, expresada como el promedio + error estándar de al menos tres experimentos independientes. *, p-valor<0.05; **, p-valor<0.01; ***, p-valor=0.005. (B) Inmunofluorescencias de HDMVEC transfectadas con los ARN de interferencia control y RhoB indicados, estimuladas con TNF durante 7 h y trombina durante 2,5 h. Las preparaciones fueron teñidas para β -catenina y F-actina. La cuantificación se realizó en función de la intensidad relativa de β -catenina en las uniones intercelulares en tres experimentos independientes. Barra de escala 20 μ m. * p-valor <0.05; ** p-valor <0.01.

1.5. RhoB regula la re-extensión de protrusiones de membrana después de la estimulación con trombina en células endoteliales humanas.

Ya se demostró que la recuperación de la función de barrera tras la estimulación con trombina puede darse independientemente del establecimiento de uniones intercelulares (Marcos-Ramiro, tesis doctoral, 2015). En este sentido, decidimos estudiar el efecto de la trombina y la depleción de RhoB en condiciones de subconfluencia tanto en HDMVEC como en HUVECs.

Se transfectaron HDMVEC con distintos ARN de interferencia control y para RhoB. Observamos que el área celular era mayor –más del doble- en células deplecionadas para RhoB en el tiempo correspondiente a la recuperación del área celular (“*respreading*”) tras la estimulación con trombina, es decir, 2.5 h después de la adición de dicha citoquina (Fig. 5A). Debido a las limitaciones en cuanto a la disponibilidad de células microvasculares de piel humana, y con el objetivo de comparar y de realizar una cinética más detallada, se transfectaron HUVEC con distintos ARN de interferencia control y para RhoB, se pre-trataron con TNF durante 7 h y se estimularon con trombina a 0, 5, 30 y 60 min, con el objetivo de medir el efecto tanto en el momento de la contracción aguda como en el de la re-extensión de membrana (Fig. 5B). Al igual que en el experimento anterior, observamos que las células deplecionadas para RhoB presentan un área celular mayor (1,5 veces) que las células control en el tiempo correspondiente a la recuperación tras el estímulo con trombina (60 min). Sin embargo, la reducción de RhoB no tiene efecto sobre el proceso de contracción aguda, probablemente porque juega un papel redundante junto con RhoA y RhoC en la contracción mediada por actomiosina.

Estos datos sugieren que RhoB regula negativamente la re-extensión celular en células endoteliales microvasculares y vasculares tratadas con TNF tras la contracción inducida por trombina, independientemente del establecimiento de contactos célula-célula, lo cual concuerda con los experimentos consignados en Marcos-Ramiro, tesis doctoral, 2015, donde la expresión de una forma constitutivamente activa de RhoB (RhoBV14) reduce significativamente el área celular en los tiempos de recuperación después estimular HUVEC con trombina.

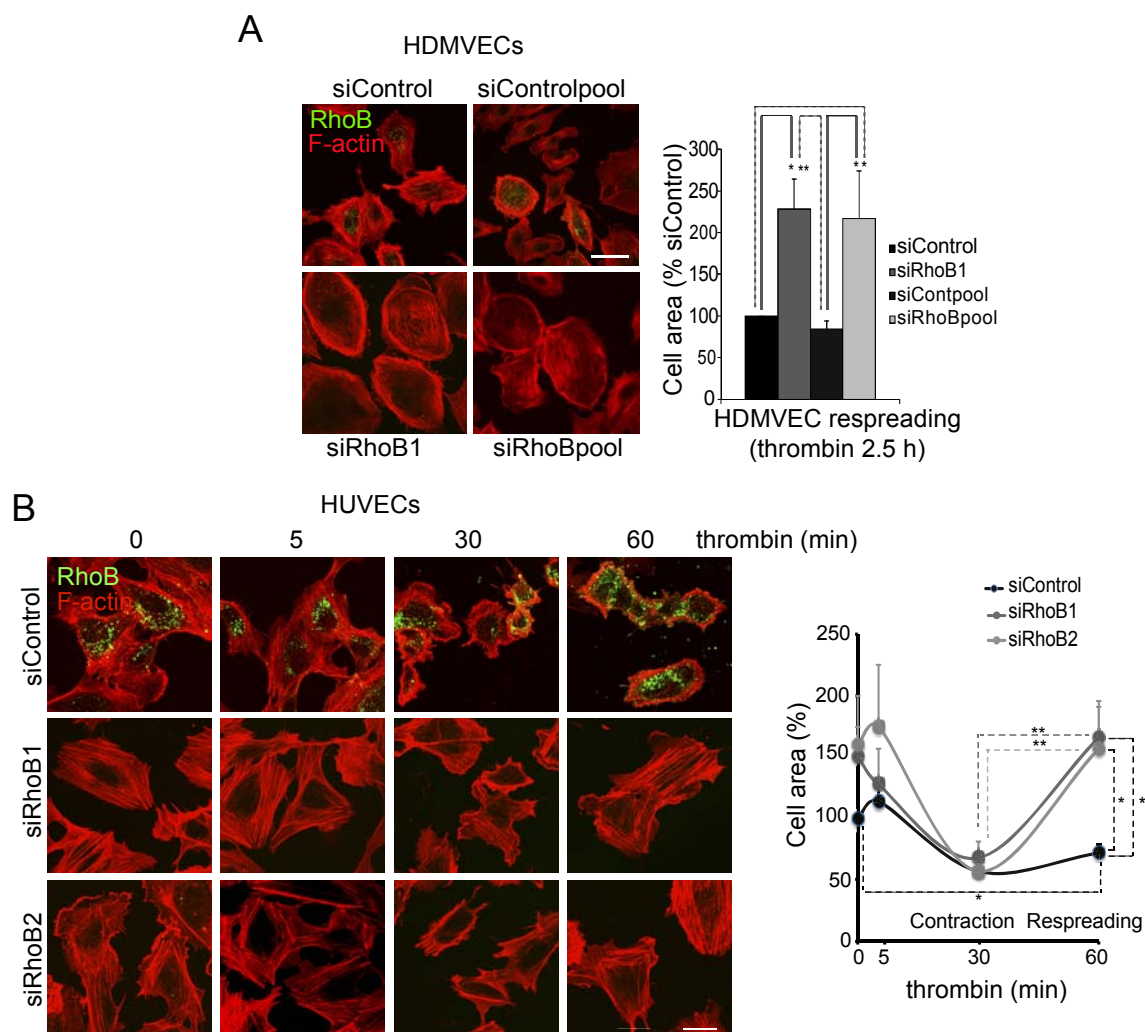


Figura 5. RhoB regula la re-extensión celular tras la contracción mediada por trombina en células pre-tratadas con TNF durante 7h. (A) HDMVEC fueron tratadas con los ARN de interferencia indicados, estimuladas con TNF durante 7 h, con trombina durante 2.5 h (*respreading*), fijadas y teñidas para RhoB y F-actina. Posteriormente, el área celular fue cuantificada para cada condición. El gráfico muestra la cuantificación del área celular (en porcentaje), expresada como el promedio + SEM de al menos 50 células por experimento de tres experimentos independientes. *p-valor<0.05, ** p-valor <0.01, Barra de escala 10 μ m. (B) HUVEC previamente transfectadas con los ARN de interferencia indicados y tratadas con TNF durante 7 h fueron estimuladas con trombina durante 0, 5, 30 ó 60 min, fijadas y teñidas para RhoB y F-actina. El gráfico de la derecha muestra la cuantificación del área celular (en porcentaje), expresada como el promedio + SEM de al menos 50 células por experimento de tres experimentos independientes. *p-valor <0.04; **p-valor <0.03.

1.6. RhoB y Rac1 co-localizan parcialmente en HDMVEC.

Teniendo en cuenta que la recuperación de la función de barrera en células endoteliales depende de la re-extensión celular y que la GTPasa Rac1 es un regulador maestro de la generación de protrusiones de membrana (Price et al., 1998), decidimos estudiar si RhoB regula la función de la GTPasa Rac1.

En un primer momento, para poder caracterizar una posible interacción entre RhoB y Rac1, se transfectaron HDMVEC con mCherry-Rac1, se pre-trataron con TNF durante 7 h, se estimularon con trombina durante 2,5 h, se fijaron y se tiñeron para RhoB endógeno (Fig. 6). En dicho experimento, se observa que RhoB y Rac1 co-localizan parcialmente en un compartimento vesicular, existiendo también una población de Rac1 en protrusiones de membrana donde RhoB no está presente.

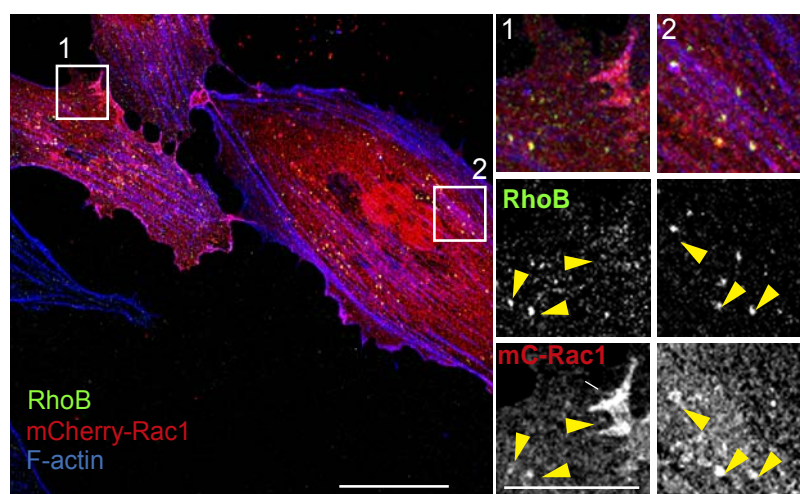


Figura 6. RhoB endógeno co-localiza parcialmente con Rac1 en HDMVEC. RhoB endógeno y mCherry-Rac1 co-localizan parcialmente en un compartimento vesicular en HDMVEC confluentes, pretratadas con TNF y estimuladas durante 2.5 h con trombina (flechas amarillas). mCherry-Rac1 se localiza también a nivel de protrusiones de membrana. Barra de escala 20 μ m. Barra escala ampliación 10 μ m.

1.7. RhoB co-localiza con marcadores endosomales tardíos

Con el fin de acotar la localización intracelular de RhoB, analizamos la distribución de RhoB endógeno con respecto a varios marcadores de tráfico endosomal. Puesto que la distribución de RhoB en células microvasculares es muy parecida a la observada en HUVECs, y debido a la dificultad de obtener las primeras, realizamos estos experimentos en HUVECs. HUVEC previamente estimuladas con TNF fueron cargadas con transferrina-TRITC durante 5 min antes de realizar ensayos de pulso y caza. Una pequeña fracción de vesículas positivas para RhoB se solapó con este marcaje de transferrina, sugiriendo que RhoB podría localizarse en endosomas tempranos (Fig. 7A) (Fernandez-Borja et al., 2005). Además, también observamos cierta co-localización de RhoB con el marcador endosomal temprano Rab5 en los tiempos de estimulación por trombina en HUVEC transfectadas con Rab5-GFP (Fig. 7B).

Por otro lado, la co-localización parcial entre RhoB y transferrina se redujo en células estimuladas con trombina y cargadas simultáneamente con transferrina-TRITC durante 1.2 h, lo cual sugiere que RhoB no co-localiza significativamente en un compartimento endosomal de reciclaje durante la recuperación de la barrera endotelial. En línea con estos datos, la co-localización de RhoB con el marcador de reciclaje GFP-Rab11 (Jones et al., 2006) también fue baja en los diferentes tiempos de estimulación por trombina. Igualmente, la co-localización de las vesículas positivas para RhoB con los marcadores de reciclaje rápido Rab4 y EHD1 (Yudowski et al., 2009; Sharma et al., 2009) fue despreciable. Sin embargo, las vesículas y *clusters* perinucleares de RhoB co-localizaron claramente con el marcador endosomal tardío Rab7 (Wang et al., 2011), sugiriendo que RhoB se distribuye a lo largo de la ruta endocítica entre los endosomas tempranos y tardíos, y principalmente en estos últimos, una distribución parecida a la observada en células epiteliales (Wherlock et al., 2004). La triple transfección de mCherry-Rac1, la forma constitutivamente activa de RhoB (RhoBV14) y GFP-Rab7 sugirió una colocación parcial de RhoB y Rac1 en este compartimento endosomal tardío en las cercanías del aparato de Golgi (Figura 7C, cuadro 1) aunque no en la parte más periférica de la célula (Figura 7C, cuadro 2).

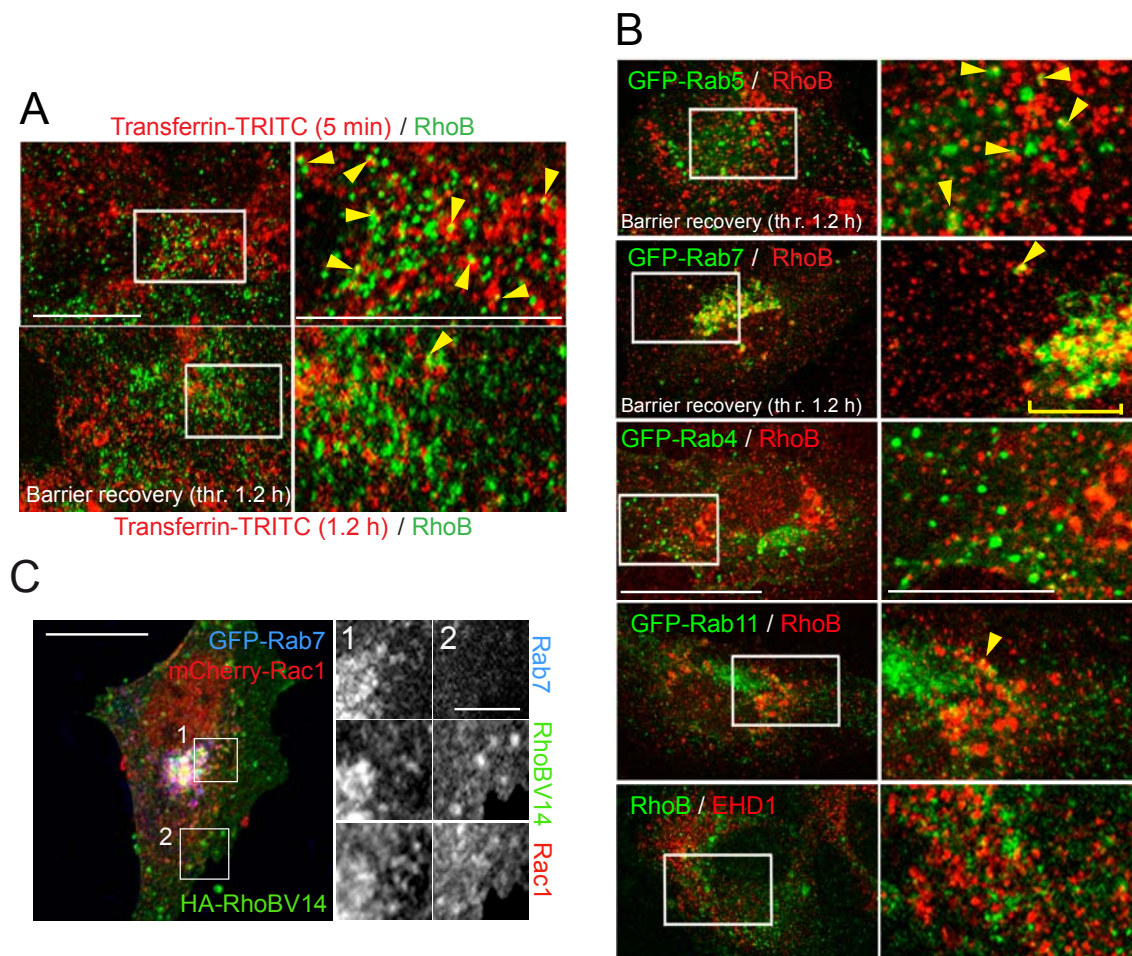


Figura 7. Localización subcelular de RhoB endógeno respecto a distintos marcadores endosomales en HUVEC. (A) Localización de RhoB endógena en HUVEC pre-tratadas con TNF previamente incubadas con transferrina-TRITC durante 5 min para localizar endosomas tempranos y durante 1,2 h para localizar endosomas de reciclaje durante la recuperación de la barrera. Barra de escala 20 μ m. (B) Localización de RhoB endógeno en células transfectadas con las proteínas RabGFP que se indican, así como con EHD1. RhoB co-localiza mayoritariamente con vesículas positivas para Rab7 en un compartimento perinuclear. Barra de escala 20 μ m. (C) Localización de RhoBV14, Rac1cherry y Rab7GFP en HUVEC. Barra de escala 20 μ m.

1.8. RhoB se localiza en estrecha proximidad con Rac1.

Mediante microscopía confocal observamos una co-localización parcial de RhoB y Rac1 tanto en HUVEC (Marcos-Ramiro et al., 2016) como en HDMVEC. Sin embargo, no se detectó ninguna asociación entre ambas proteínas en experimentos de co-inmunoprecipitación (datos no mostrados; Marcos-Ramiro, tesis doctoral, 2015). En este sentido, decidimos investigar si RhoB y Rac1, por su estrecha proximidad, pudieran establecer interacciones transitorias y por tanto difíciles de detectar por experimentos convencionales de asociación. Para ello, generamos una construcción de RhoB fusionada con el mutante de la biotina-ligasa BirA en su dominio N-terminal. La proteína de fusión resultante tiene la capacidad de biotinar las proteínas que se encuentran en su proximidad. Así, realizamos ensayos denominados de marcaje de proximidad BioID, los cuales permiten

detectar las proteínas biotiniladas y, por tanto, próximas a RhoB en las condiciones estudiadas (Roux et al., 2012).

Los ensayos de BioID se llevaron a cabo transfectando las construcciones RhoB-BirA y Rac1-GFP en células HEK293, pre-tratándolas con TNF, estimulándolas con trombina a diferentes tiempos y analizando la población de proteínas biotiniladas mediante dos estrategias diferentes.

Por un lado, con el fin de purificar las proteínas biotiniladas, se realizaron ensayos de *pull-down* con neutravidina-agarosa (Fig. 8). Observamos en la inmunodetección que la proteína GFP-Rac1 únicamente se biotinila si se añade biotina exógena al medio y si la construcción que codifica para ella es co-transfectada con la que codifica para RhoB-BirA. La co-transfección de RhoB-BirA con GFP no indujo biotinilación alguna de la proteína GFP. Nótese que la sobreexpresión de RhoB-BirA indujo una reducción de la expresión de GFP-Rac1, comparado con las células que expresaban sólo GFP-Rac1, sugiriendo un efecto sobre la dinámica y estabilidad de esta GTPasa.

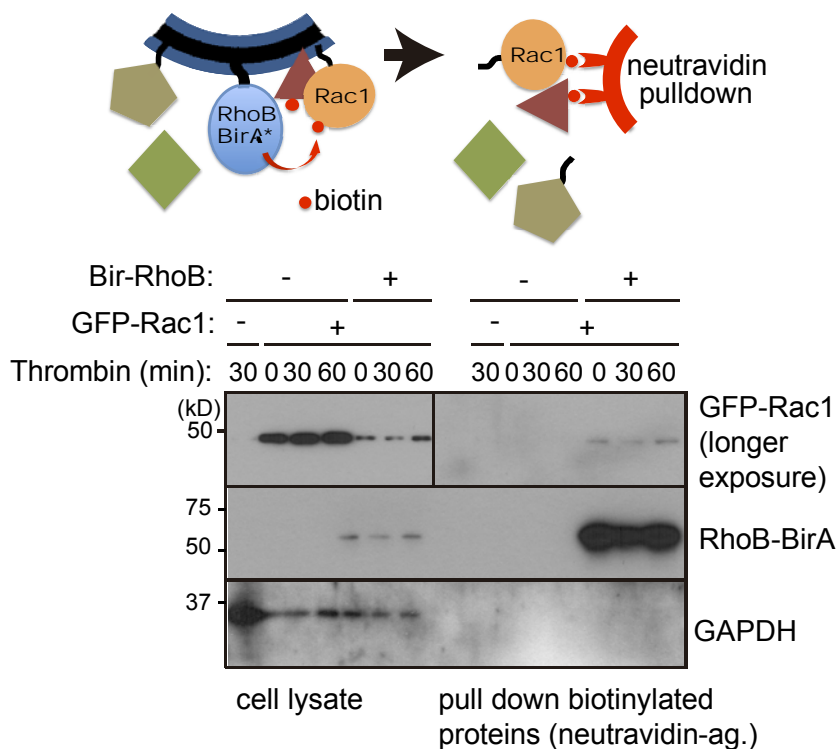


Figura 8. Ensayo de biotinilación con BirA-RhoB (BioID). Se transfectaron células HEK293 con BirA-RhoB y GFP-Rac1 según se indica. Las proteínas biotiniladas fueron precipitadas por *pull-down* con neutravidina-agarosa. Los lisados celulares totales y los correspondientes al *pull-down* fueron sometidos a western blot con los anticuerpos que se indican. En presencia de RhoB-BirA, observamos que una fracción de GFP-Rac1 se detecta en el ensayo de *pull-down*. La proteína BirA-RhoB también se biotinila a sí misma y por lo tanto precipita con neutravidina-agarosa. Nótese que, en los lisados celulares, BirA-RhoB reduce la expresión de GFP-Rac1.

Por otro lado, adoptamos una estrategia complementaria y realizamos el mismo tipo de experimento de transfección en células HEK293, pero esta vez no realizamos ensayos de *pull-down*, si no que inmunoprecipitamos GFP-Rac1 mediante un anticuerpo anti-GFP en presencia o ausencia de BirA-RhoB (Fig. 9). Las células que expresaban BirA-RhoB

indujeron la biotinilación de varias proteínas, las cuales fueron detectadas con inmunomarcaje con estreptavidina-peroxidasa. Un mínimo de cuatro proteínas biotiniladas fueron encontradas en los inmunoprecipitados de GFP-Rac1. Dos de ellas coincidieron con las que fueron detectadas por inmunoblot empleando un anticuerpo anti-Rac1, correspondiendo con los pesos moleculares de las proteínas GFP-Rac1 y Rac1 endógena, la cual fue co-inmunoprecipitada con GFP-Rac1. En conjunto, estos datos sugieren que Rac1 y RhoB podrían encontrarse en estrecha proximidad, estableciendo interacciones lábiles y transitorias.

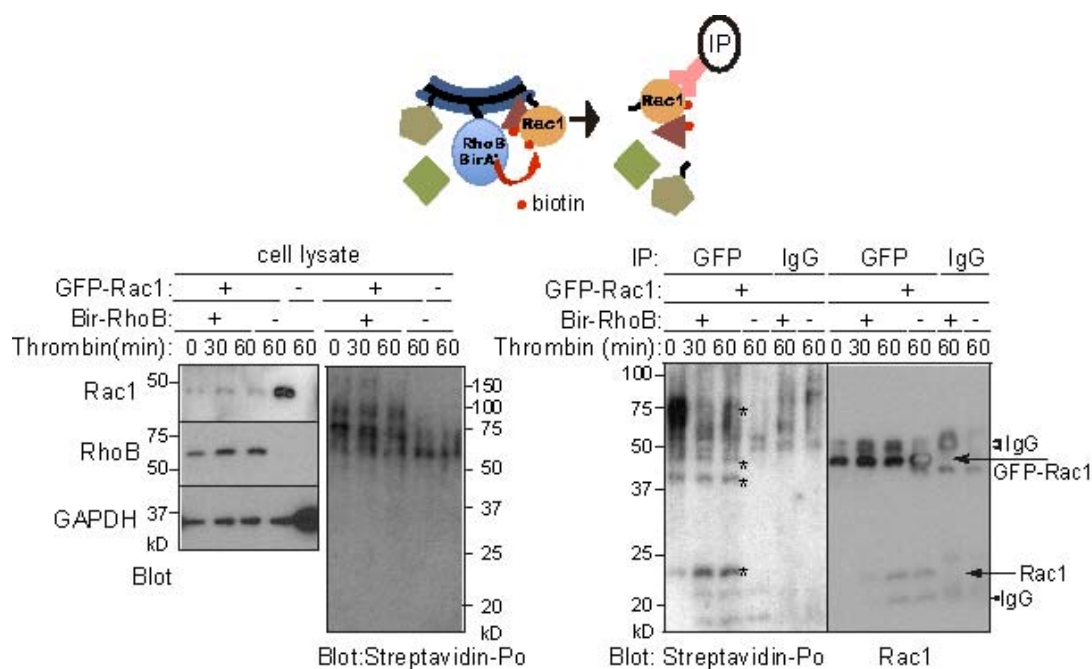


Figura 9. Ensayo de biotinilación con BirA-RhoB (BioID). Se transfectaron células HEK293 con BirA-RhoB y GFP-Rac1 según se indica. Se inmunoprecipitó GFP-Rac1 con anticuerpos anti-GFP. Las proteínas biotiniladas fueron detectadas por inmunoblot con Estreptavidina peroxidasa (asteriscos). IgG: anticuerpo control específico de isotipo. La co-expresión de BirA-RhoB y GFP-Rac1 reduce los niveles de GFP-Rac1 en los lisados celulares.

1.9. La depleción de RhoB incrementa la actividad de Rac1.

RhoB se encuentra en un compartimento endosomal tardío junto con Rac1 y afecta una de las principales funciones atribuidas a Rac1: la extensión de membrana celulares y el “*spreading*”. Nos preguntamos a continuación si RhoB regula la actividad de Rac1, y si lo hace específicamente durante el proceso de re-extensión de la membrana celular o también durante la contracción aguda inducida por trombina. Se realizaron ensayos de *pull-down* de actividad GTPasa durante una cinética de estimulación por trombina en HUVEC pre-tratadas con TNF durante 7 h (Fig. 10). En éstos, se observó que en las células control, la actividad de Rac1 disminuía (a 0.4 respecto al valor inicial) durante los primeros 30 min de estimulación, aumentando luego hasta 0.6 hacia los 60 min, tiempo coincidente con la re-extensión de la superficie celular. Sin embargo, en las células silenciadas para RhoB, la actividad de Rac1 disminuyó en menor medida (a 0,8 o 0,6 respecto a los valores iniciales) durante los primeros 30 min, tiempo de mayor contracción celular, y aumentó

significativamente a 60 min respecto a las células control (valores superiores a 1, es decir, a los valores de actividad iniciales). Estos resultados sugieren que RhoB regula negativamente la actividad de Rac1 en todos los tiempos de estimulación con trombina, pero su función es más determinante y significativa a tiempos coincidentes con el proceso de extensión de protrusiones de membrana.

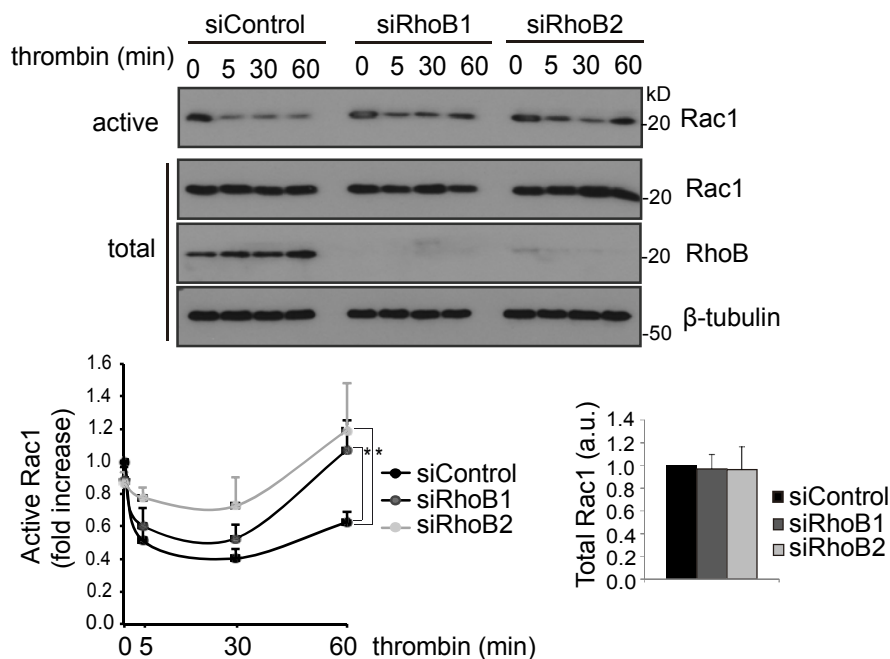


Figura 10. RhoB regula la actividad de Rac1. HUVECs transfectadas con siARN control o siARN de RhoB fueron pre-tratadas con TNF y estimuladas con trombina a los tiempos que se indican. Las células fueron lisadas y se realizaron ensayos de *pull-down* con el fin de detectar los niveles de Rac1 GTP (Rac1 activo). Se muestra el efecto de la depleción de RhoB en la activación de Rac1. El gráfico inferior muestra la cantidad de Rac1 activa normalizada frente a la cantidad total de Rac1. El gráfico de la derecha muestra la media y el error estándar medio de tres experimentos independientes en los que se midieron los niveles totales de Rac1.* p-valor<0.05.

En conjunto, estos datos sugieren que RhoB localiza con Rac1 en un compartimento endosomal tardío y regula negativamente su actividad y limitando así la formación de protrusiones de membrana tras una contracción aguda, tanto en HUVECs como en HDMVEC. Esto parece ser relevante desde el punto de vista más fisiológico, porque RhoB se expresa mayoritariamente en vénulas postcapilares de tejido con enfermedad inflamatoria crónica. En línea con estos resultados, se ha observado que la inhibición de Rac1 con NSC23766 en células silenciadas para RhoB cancela el efecto de la ausencia de RhoB sobre el incremento en la formación de protrusiones de membrana y, por ende, la aceleración de la recuperación de la función de barrera (Marcos-Ramiro, tesis doctoral).

2. MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA BARRERA ENDOTELIAL DURANTE LA RESPUESTA INFLAMATORIA DEPENDIENTES DE LAS UNIONES INTERCELULARES

La función de barrera es una de las propiedades clave del endotelio vascular (Dejana, 2004). En este sentido, la integridad de los complejos de uniones intercelulares es esencial para el correcto mantenimiento de la cohesión entre células endoteliales. Sin embargo, dicho endotelio, lejos de ser una frontera estática entre la sangre y el tejido subyacente, es capaz de regular muy finamente su permeabilidad en respuesta a estímulos proinflamatorios como el TNF (Le Guelte y Gavard, 2011). En este sentido, las células endoteliales emplean diferentes mecanismos moleculares para llegar a un compromiso funcional entre mantenimiento y pérdida de función de barrera (Marcos-Ramiro et al., 2014).

La Cadherina Vascular Endotelial (VE-cadherina) es una proteína esencial para el correcto establecimiento de las uniones intercelulares (Dejana y Vestweber, 2013). Se ha demostrado que la estimulación de células endoteliales por TNF produce un aumento en los niveles de fosforilación de los niveles totales VE-cadherina, facilitándose su disociación de p120-catenina, lo cual provoca un debilitamiento de las uniones adherentes (Angelini et al., 2006; Potter et al., 2005). Sin embargo, la regulación de la dinámica de VE-cadherina entre el citoplasma y la superficie celular en este contexto no está bien caracterizada. Así, la pérdida de función de las uniones adherentes endoteliales en respuesta a citoquinas inflamatorias como TNF a menudo no correlaciona con una disminución de los niveles de la cadherina vascular, sino tan sólo con una redistribución (Angelini et al. 2006; Cain et al., 2010; Millán et al., 2010; Fernández-Martín et al., 2012). Por tanto, nos planteamos el objetivo de investigar en profundidad el efecto de TNF sobre las uniones adherentes y, en concreto, sobre la dinámica de VE-cadherina en la superficie endotelial.

2.1. La estimulación de HUVEC con TNF reduce la vida media de la VE-cadherina de superficie.

Con el objetivo de caracterizar la duración de la vida media de la proteína VE-cadherina presente en la superficie de células endoteliales humanas HUVEC, realizamos ensayos de marcaje con Sulfo-NHS-Biotina. Las células fueron pre-estimuladas o no con TNF durante 24 h, marcadas con biotina en su superficie, lisadas a diferentes tiempos (0, 2, 4 y 6 h post-biotinilación) y sometidas a un *pull-down* con neutravidina agarosa para separar las proteínas biotiniladas del lisado celular. Así, pudimos observar que los niveles de superficie de VE-cadherina decrecen con mayor celeridad en células estimuladas con TNF durante 8 ó 24 h que en células no estimuladas (Fig. 11A y B). Más concretamente, la vida media de la proteína VE-cadherina de superficie en células no estimuladas es de unas 6 h, mientras que en el caso de las células estimuladas con TNF oscila entre las 2 y las 3 h. Nótese que de forma parecida a lo observado previamente en el laboratorio (Fernández-Martín et al., 2012), no se detectaron cambios significativos en los niveles totales de VE-cadherina ni en los niveles de VE-cadherina biotinilada antes de la caza a distintos tiempos (superficie, t=0).

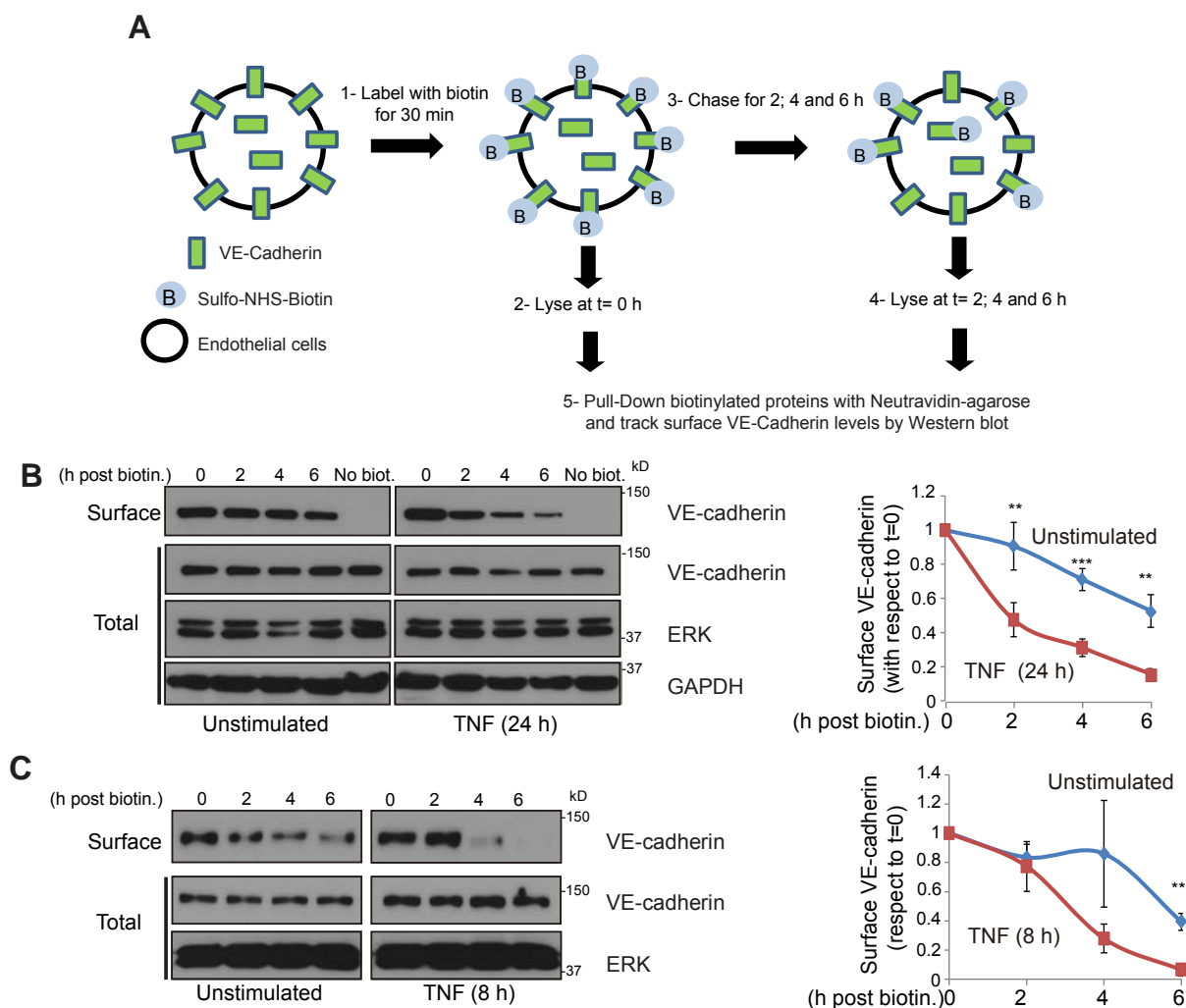


Figura 11. La vida media de la proteína VE-cadherina presente en la superficie de HUVEC confluentes se reduce significativamente tras la estimulación con TNF a 8 y 24 h: Marcaje de la superficie celular con biotina (A) Esquema que resume el experimento de marcaje de la superficie celular realizado con Sulfo-NHS-Biotina. Se biotinilan todas las placas a la vez y luego se lisan a los diferentes tiempos indicados. Posteriormente, se realiza una purificación de las proteínas biotiniladas por *pull-down* y se identifica la proteína VE-cadherina por inmunoblot. **(B)** HUVEC fueron cultivadas en medio con niveles reducidos de nutrientes y estimuladas o no con TNF durante 24 h. Se marcó la superficie celular de todas las placas al mismo tiempo y se lisaron secuencialmente en los tiempos indicados. Células no biotiniladas fueron sometidas al *pull-down* como control negativo. El gráfico de la derecha corresponde a la cuantificación de los niveles de superficie de VE-cadherina de 3 experimentos independientes. ** p-valor<0.01; *** p-valor<0.001. **(C)** HUVEC fueron cultivadas en medio con niveles reducidos de nutrientes y estimuladas o no con TNF durante 8 h. Se marcó la superficie celular de todas las placas al mismo tiempo y se lisaron secuencialmente en los tiempos indicados. El gráfico de la derecha corresponde a la cuantificación de los niveles de superficie de VE-cadherina de 3 experimentos independientes. ** p-valor<0.01.

Con el fin de confirmar estos resultados, empleamos una segunda estrategia que nos permitiera monitorizar la vida media de la población de VE-cadherina de superficie en células endoteliales. Así, decidimos marcar selectivamente la población de VE-cadherina en la superficie de HUVEC confluentes con un anticuerpo específico cuyo epítipo se encuentra en el dominio extracelular de VE-cadherina (Fig. 12A). Se ha demostrado previamente que el uso de este anticuerpo no altera la función de VE-cadherina ni la permeabilidad endotelial (Benn et al., 2016). En dichos experimentos observamos que, 4 h

después del marcaje con el anticuerpo, las células no estimuladas con TNF presentan niveles de anticuerpo anti-VE-cadherina de superficie similares al control, mientras que las células estimuladas con TNF durante 24 h presentan niveles significativamente menores (Fig. 12B). Estos resultados apoyan el hecho de que la estimulación de HUVEC con TNF provoca una reducción de la vida media de la población de VE-cadherina de superficie.

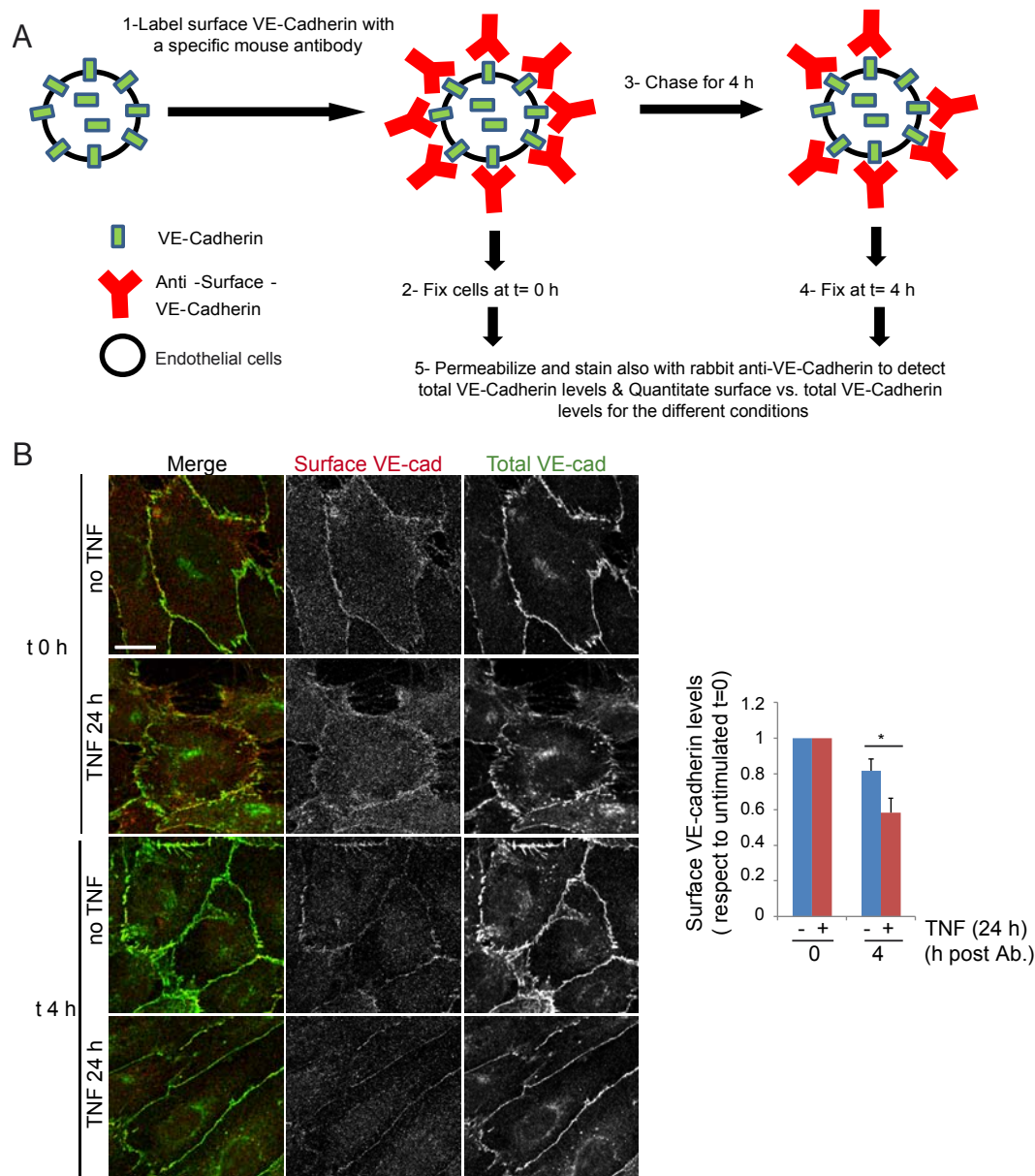


Figura 12. La vida media de la proteína VE-cadherina presente en la superficie de HUVEC se reduce tras la estimulación con TNF: Marcaje con anticuerpo específico de VE-cadherina de superficie. (A) Esquema que resume el experimento de marcaje de la superficie celular realizado con un anticuerpo específico de VE-cadherina de superficie (BV6). Se marcaron con dicho anticuerpo todas las condiciones a la vez y luego fijaron a los diferentes tiempos indicados. Posteriormente, se realizó un segundo marcaje con un anticuerpo capaz de detectar la población total de VE-cadherina y se tiñó por inmunofluorescencia para las poblaciones de VE-cadherina total y de superficie con el fin de cuantificar los niveles de fluorescencia correspondientes (B) HUVEC fueron cultivadas en medio con niveles reducidos de nutrientes y estimuladas o no con TNF durante 24 h. Se marcó la superficie celular de todas las células al mismo tiempo y se fijaron a los tiempos indicados. El gráfico de la derecha corresponde a la media \pm SEM de los niveles de superficie de VE-cadherina de 3 experimentos independientes. * p -valor < 0.05 .

2.2. La estimulación de HUVEC con TNF acelera la degradación de VE-cadherina de superficie por vía proteasoma.

Se ha descrito que la pérdida de VE-cadherina en un contexto inflamatorio puede depender de la degradación por vía lisosomal o dependiente del proteasoma (Xiao et al., 2003; Sawant et al., 2011). Por lo tanto, con el objetivo de dilucidar si la aceleración en la pérdida de VE-cadherina de superficie radicaba en su degradación por una u otra vía, empleamos una batería de inhibidores de ambas vías y observamos que únicamente la inhibición del proteasoma con MG132 y lactacistina limitó significativamente –a la mitad– la desaparición de VE-cadherina inducida por TNF en un experimento de marcaje con biotina, caza de 4 h tras el marcaje y detección posterior de la VE-cadherina biotinilada por ensayo de *pull-down* (Fig. 13). Estos datos sugieren por tanto que la reducción de la vida media de la VE-cadherina de superficie depende principalmente de la degradación de la misma por la vía del proteasoma. Nótese que los niveles de proteína total se vieron poco afectados por los inhibidores, lo que sugiere la existencia de un reemplazamiento rápido de la VE-cadherina de superficie degradada.

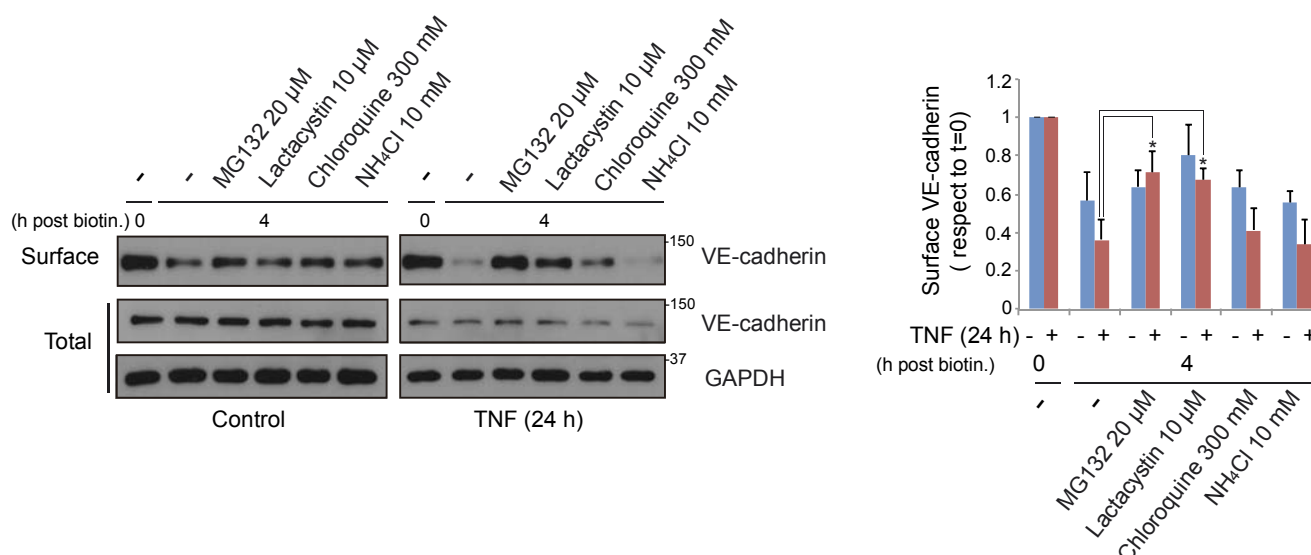


Figura 13. TNF aumenta la degradación de VE-cadherina de superficie por la vía del proteasoma.

HUVEC fueron cultivadas en medio con niveles reducidos de nutrientes y estimuladas o no con TNF durante 24 h. Se añadieron los inhibidores que se indican, se biotinizaron todas las placas a la vez y se lisaron a los tiempos indicados. Los extractos totales y los correspondientes al *pull-down* fueron revelados por inmunoblot con el fin de detectar las proteínas que se indican. El gráfico de la derecha corresponde a la media \pm SEM de los niveles de superficie de VE-cadherina de 3 experimentos independientes. * p-valor<0.05.

2.3. La estimulación de HUVEC con TNF induce de forma transitoria la expresión de VE-cadherina.

En el apartado anterior hemos observado que la estimulación de HUVEC con TNF provoca una reducción en la vida media de la proteína VE-cadherina localizada en la superficie celular, mientras que los niveles estacionarios de superficie y totales de la misma permanecen constantes. Esto sugiere la existencia de mecanismos compensatorios para

reemplazar la VE-cadherina degradada en las uniones adherentes. Para ello, realizamos cinéticas de estimulación con TNF a 0, 4, 8 y 24 h en HUVEC e investigamos los niveles totales y de superficie de VE-cadherina en cada tiempo (Fig. 14). Observamos que TNF induce un aumento transitorio pero significativo de la expresión de VE-cadherina a 4 y 8 h, alcanzándose un pico de 1.6 veces a las 8 h de estimulación, mientras que los niveles de superficie permanecen constantes.

Por otro lado, observamos que la cantidad total de VE-cadherina fosforilada correlaciona con la cantidad total de VE-cadherina no-fosforilada (Fig. 14), lo cual indica que el aumento de los niveles de esta proteína corresponde a un incremento de la población que no se encuentra unida a p120-catenina formando uniones adherentes. Además, se observa que a 4 h de estimulación por TNF parte de la VE-cadherina asociada a la superficie celular presenta un nivel de fosforilación mayor que a los demás tiempos, aunque en comparación con la proporción de VE-cadherina total detectada en la superficie, la fracción de VE-cadherina fosforilada en el *pull-down* es minoritaria (Fig. 14). Este resultado sugiere que TNF incrementa los niveles de VE-cadherina intracelular en respuesta a TNF. En efecto, esta cadherina no está unida a p120-catenina y no está formando uniones adherentes. Teniendo en cuenta los resultados de la Fig. 11, esta cadherina no proviene de la población inicialmente en la superficie, ya que ésta incrementa su degradación en presencia de TNF. En conjunto, nuestros resultados sugieren que este incremento de VE-cadherina procede de la síntesis *de novo*.

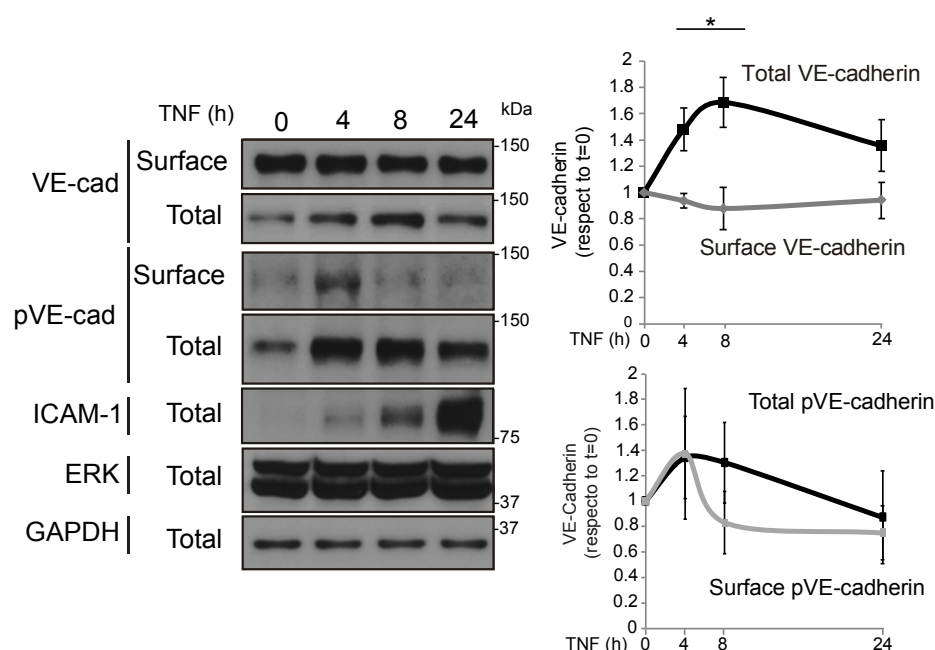


Figura 14. TNF induce la expresión de VE-cadherina en células endoteliales humanas. HUVEC fueron estimuladas con TNF a los tiempos que se indican y marcadas en su superficie con Sulfo-NHS-Biotina. Éstas fueron lisadas y sometidas a ensayos de *pull-down* con el fin de purificar la fracción proteica de superficie. Posteriormente, se detectaron las poblaciones total y de superficie tanto de VE-cadherina como de p-VE-cadherina por inmunoblot. Los gráficos de la izquierda corresponden a la media \pm SEM de los niveles totales y de superficie de VE-cadherina y p-VE-cadherina de 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05.

Realizamos las mismas cinéticas de TNF en otros tipos celulares endoteliales (Fig. 15) y observamos la misma tendencia que en HUVEC. En efecto, en la línea celular endotelial inmortalizada EAhy.926 (Fig. 15A), y en la línea celular de barrera hematoencefálica HCMEC/D3 (Fig. 15B), observamos un aumento transitorio y significativo de expresión de VE-cadherina de 1.4 y 1.5 veces, respectivamente. Sin embargo, el aumento en células primarias microvasculares, es mucho más moderado (Fig. 15C).

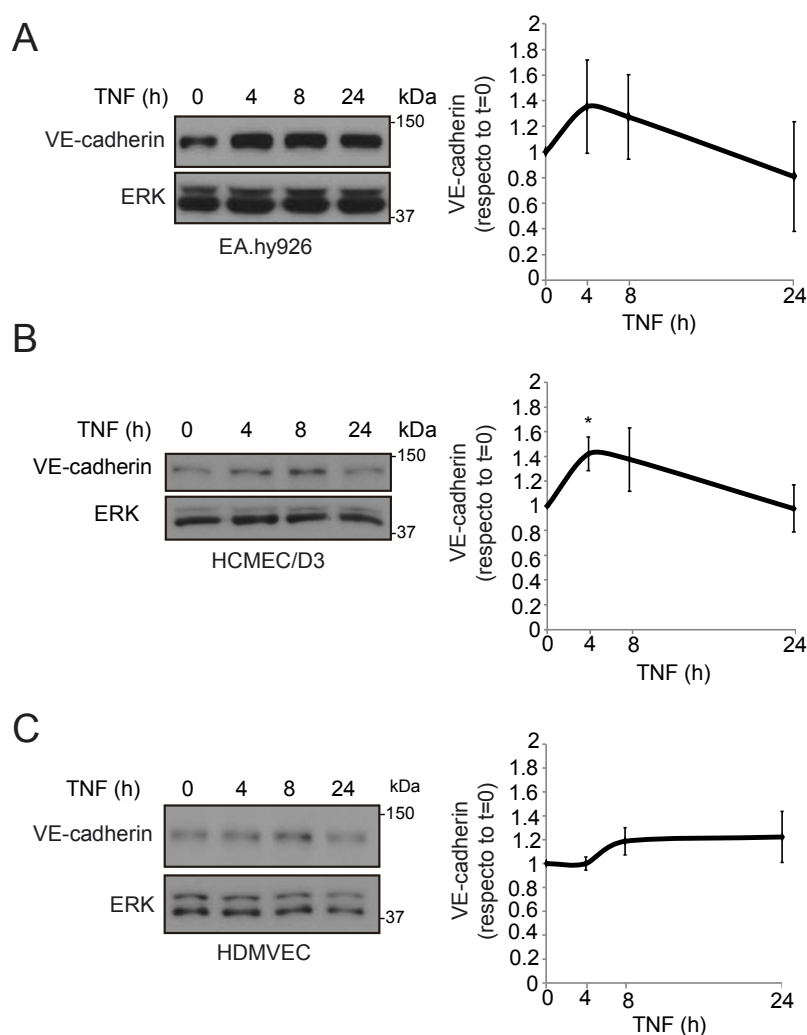


Figura 15. Los niveles totales de VE-cadherina aumentan en respuesta a TNF en diferentes tipos celulares endoteliales. Células EAhy.925, HCMEC/D3 y HDMVEC fueron estimuladas con TNF durante los tiempos que se indican, lisadas y la cantidad total de VE-cadherina monitorizada por inmunoblot. Los gráficos a la derecha de cada panel indican la media \pm SEM de los niveles totales de VE-cadherina en función del tiempo de estimulación con TNF para cada tipo celular en 3 experimentos independientes. * p-valor < 0.05.

En este sentido, quisimos estudiar si dicho aumento se debía a un incremento del ARN mensajero de VE-cadherina a nivel transcripcional. Para ello, realizamos cinéticas de TNF a los mismos tiempos en HUVEC cuyo ARN mensajero fue purificado con el fin de someterlo a experimentos de RT-PCR con dos pares de oligos específicos de VE-cadherina (Fig. 16A). En consonancia con los datos obtenidos, observamos un aumento significativo

de 1.4 veces de los niveles de mRNA de VE-cadherina a 4 h y 1.5 veces a 8 h de estimulación por TNF. Además, realizamos una aproximación complementaria por inmunofluorescencia y observamos que HUVEC presentan mayores niveles de VE-cadherina total, principalmente tras 8 h de estimulación con TNF, observándose un incremento de la VE-cadherina intracelular en una región Golgi (Fig. 16B).

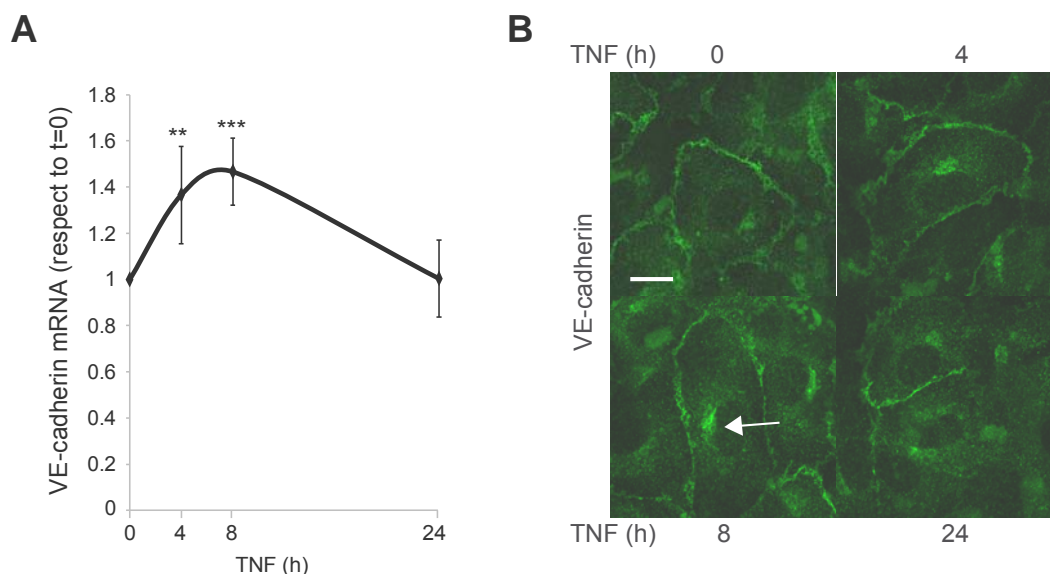


Figura 16. Los niveles de mRNA de VE-cadherina aumentan en respuesta a TNF en diferentes tipos celulares endoteliales, lo cual correlaciona con un aumento de la población intracelular de VE-cadherina en HUVEC. (A) HUVEC fueron estimuladas con TNF durante los tiempos que se indican, lisadas con trizol, su ARN mensajero purificado y sometido a RT-PCR. El gráfico muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes con 2 pares de oligos para cada RT-PCR. **p-valor<0.01; ***p-valor<0.001. (B) HUVEC fueron estimuladas con TNF durante los tiempos indicados, fijadas y sometidas a tinción por inmunofluorescencia con un anticuerpo capaz de reconocer la población total de VE-cadherina. La flecha blanca señala la población intracelular de VE-cadherina, en una zona similar a la red trans-Golgi. Barra de escala, 20 μ m.

Por otro lado, como los complejos de uniones adherentes no sólo están formados por VE-cadherina, si no que presentan una plétora de proteínas asociadas (Bazzoni y Dejana, 2004), decidimos estudiar si TNF alteraba los niveles de alguna de ellas. Para ello, inmunodetectamos diferentes proteínas de uniones intercelulares con el fin de observar si sus niveles variaban en respuesta a TNF (Fig. 17). Observamos que ninguna de las proteínas testadas (β -catenina, α -catenina, Plakoglobina o N-cadherina) presentaba diferencias significativas en sus niveles totales a lo largo de las cinéticas de estimulación por TNF.

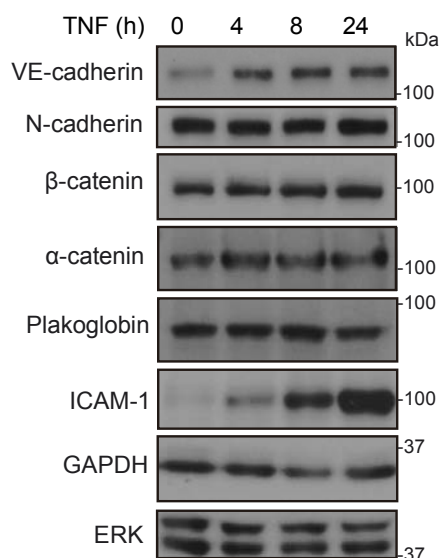


Figura 17. Los niveles totales de diferentes proteínas de uniones adherentes no varían en respuesta a TNF en HUVEC. HUVEC fueron estimuladas con TNF durante los tiempos que se indican, lisadas y la cantidad total de las proteínas de adherens junctions que se indican monitorizada por inmunoblot.

En conjunto, estos datos sugieren que el aumento de los niveles totales de VE-cadherina en respuesta a TNF es específico y parece estar mediado por un mecanismo de regulación transcripcional. Así, se incrementarían los niveles de la población de VE-cadherina intracelular, manteniéndose sus niveles de superficie constantes.

2.4. El aumento de la síntesis de VE-cadherina en respuesta a TNF está mediado por la vía NF- κ B

A continuación, pasamos a estudiar la vía de señalización celular por la cual estaba mediado el aumento de la transcripción del ARN mensajero de VE-cadherina. Dos de las principales vías de señalización inducidas por TNF son la vía NF- κ B y la vía de JNK (Madge y Pober, 2001; Crisostomo et al., 2008; Lu et al., 2016), por lo que decidimos emplear inhibidores de ambas para discriminar entre una y otra. Así, observamos por inmunoblot que la adición antes de la estimulación con TNF de BAY-11 y MG132, dos inhibidores de la vía de NF- κ B limitaba significativamente la inducción de la síntesis de VE-cadherina a 8 h de estimulación por TNF (a niveles de 0.25 y 0.65, respectivamente), mientras que la adición de SP600125, un inhibidor de la vía de JNK, a dos concentraciones diferentes (1 μ M y 3 μ M), no limitaba dicha inducción de manera significativa (Fig. 18A). Observamos un resultado similar por inmunofluorescencia, disminuyendo los niveles de VE-cadherina y desorganizándose las uniones intercelulares tras la adición de BAY11 y MG132 (Fig. 18B). Confirmamos que tanto el TNF como los inhibidores funcionaron correctamente por cuanto la proteína ICAM-1 aumentó su expresión en respuesta a TNF y vio su incremento limitado por los inhibidores de la vía de NF- κ B y por el inhibidor de la vía de JNK de manera dosis-dependiente. Por lo tanto, a la luz de estos datos podemos aseverar que la regulación transcripcional de VE-cadherina inducida por TNF estriba principalmente en la vía de NF- κ B.

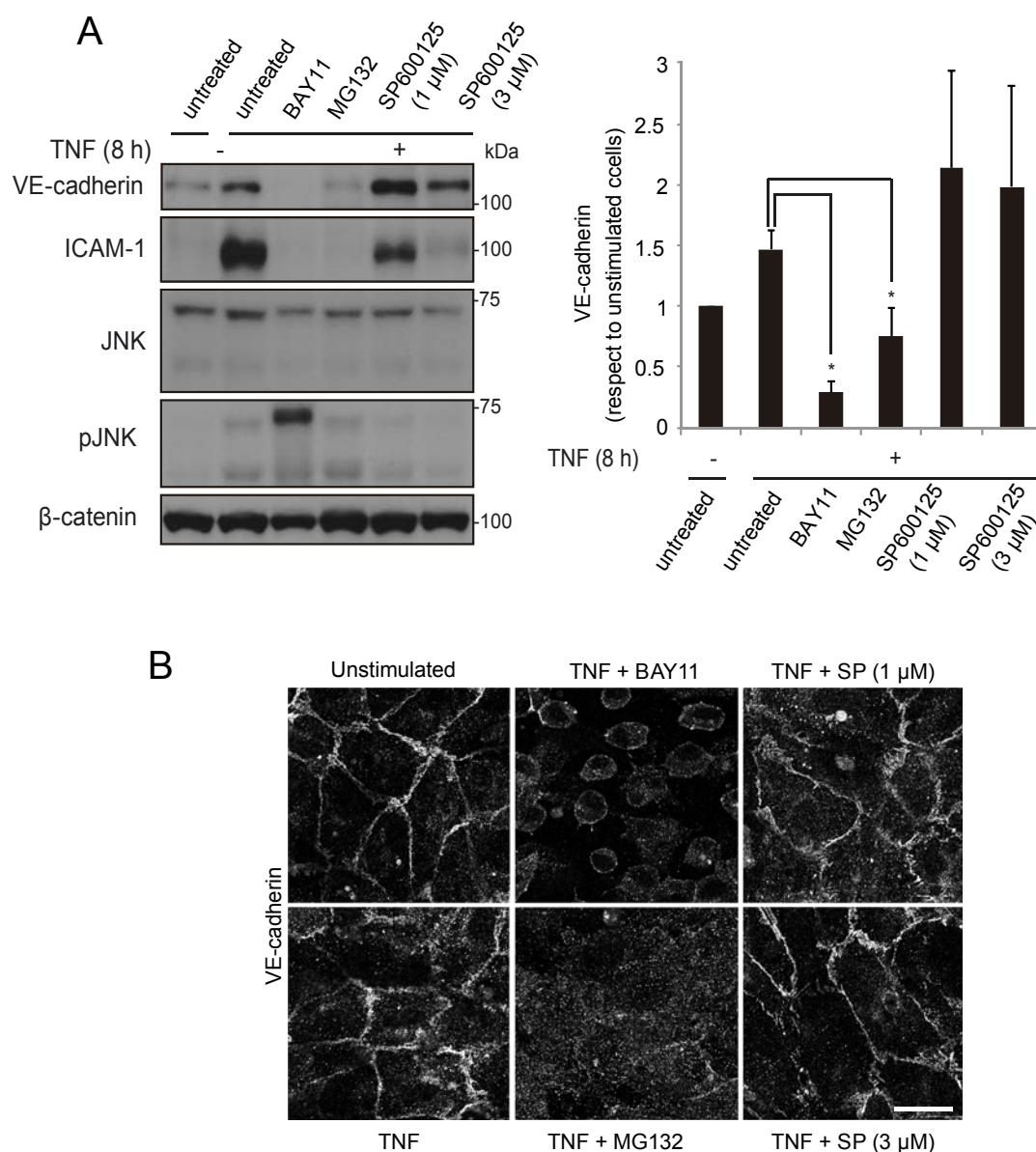


Figura 18. La regulación transcripcional de VE-cadherina inducida por TNF depende de la vía de NF- κ B. (A) HUVEC fueron estimuladas o no con TNF durante 8 h según se indica, en presencia o ausencia de los inhibidores correspondientes (10 μ M BAY11, 20 μ M MG132, 1 μ M ó 3 μ M SP600125). A continuación las células fueron lisadas y los niveles totales de VE-cadherina, ICAM-1, JNK y p-JNK monitorizados por inmunoblot. El gráfico de la derecha muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05. (B) HUVEC fueron estimuladas o no con TNF durante 8 h según se indica e incubadas con los inhibidores correspondientes (10 μ M BAY11, 20 μ M MG132, 1 μ M ó 3 μ M SP600125), fijadas y sometidas a inmunofluorescencia con un anticuerpo capaz de reconocer la población total de VE-cadherina. Barra de escala 20 μ m.

2.5. El factor de transcripción Ets1 se induce en respuesta a TNF por la vía NF- κ B y media la síntesis de VE-cadherina.

Después de caracterizar la vía de señalización que media el aumento de VE-cadherina, tratamos de identificar algún factor de transcripción que pudiera participar en dicho proceso. En la literatura se describen varios factores de transcripción de VE-cadherina tales como Erg, Ets1 o HIF2 α (Le Bras et al., 2007; Birdsey et al., 2008). De entre todos ellos, Ets1 retuvo nuestra atención por cuanto su sobre-expresión provoca un aumento de los niveles de VE-cadherina (Lelièvre et al., 2000).

Primero, observamos que Ets1 sigue una cinética de inducción por TNF similar a la de VE-cadherina, aumentando sus niveles significativamente 2.5 veces a 4 y 8 h de estimulación (Fig. 19A). Después, realizamos una cinética de TNF en HUVEC para observar por inmunofluorescencia la localización de Ets1, pudiendo constatar que dicha proteína aumenta sus niveles a 8 h de estimulación por TNF y se localiza preferentemente en el núcleo celular (Fig. 19B). Comprobamos también que la inducción de Ets1 en respuesta a TNF tiene lugar por la vía de NF- κ B con el mismo tipo de experimento que en la Fig. 18 (Fig. 20). En efecto, observamos que la adición de BAY11 a una concentración de 10 μ M provoca una drástica disminución de los niveles de Ets1 (0,25 veces el valor del control no estimulado). Sin embargo, la incubación con un inhibidor del proteasoma, MG132, que previene la señalización de NF- κ B a través de la inhibición de la degradación del inhibidor de NF- κ B (IKB), no afectó los niveles de Ets1. Esto sugiere que MG132 podría tener un efecto directo sobre la degradación del factor de transcripción, de modo que a pesar de inhibir la señalización por NF- κ B, los niveles de expresión de Ets1 no se reducirían significativamente en presencia del inhibidor. Puesto que la síntesis de VE-cadherina y Ets1 se inhibe mediante la abrogación de la vía de señalización NF- κ B, decidimos investigar la contribución de Ets1 a la expresión de VE-cadherina en células endoteliales expuestas a TNF.

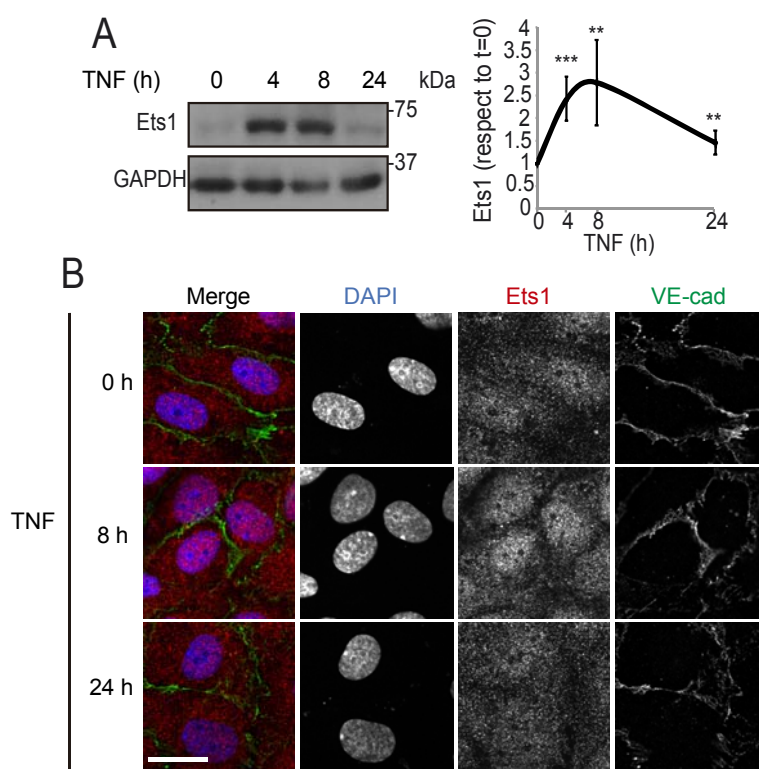


Figura 19. El factor de transcripción Ets1 es inducido en respuesta a TNF. (A) HUVEC fueron estimuladas con TNF durante 0, 4, 8 y 24 h, lisadas y las proteínas indicadas detectadas por inmunoblot. El gráfico de la derecha representa la media \pm SEM de los niveles de Ets1 correspondientes a 3 experimentos independientes. **p-valor<0.01; ***p-valor<0,001. (B) HUVEC fueron estimuladas a 0, 8 y 24 h con TNF, fijadas y sometidas a inmunofluorescencia mediante anticuerpos contra las proteínas VE-cadherina y Ets1. Los núcleos fueron teñidos en DAPI. Barra de escala 20 μ m.

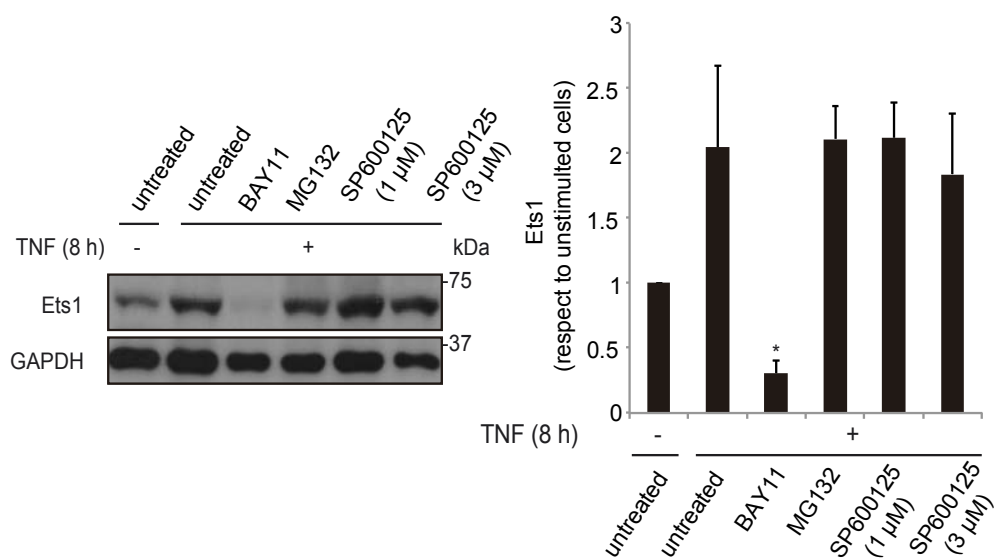


Figura 20. El factor de transcripción Ets1 es inducido en respuesta a TNF por la vía de NF- κ B. HUVEC fueron estimuladas o no con TNF durante 8 h según se indica e incubadas con los inhibidores correspondientes (10 μ M BAY11, 20 μ M MG132, 1 μ M ó 3 μ M SP600125), lisadas y los niveles totales de Ets1 monitorizados por inmunoblot. El gráfico de la derecha muestra la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05.

Finalmente, con el objetivo de estudiar el papel de Ets1 en la inducción de la síntesis de VE-cadherina en respuesta a TNF, realizamos el silenciamiento de Ets1 con un *pool* de 4 ARN de interferencia. Por un lado, observamos que la depleción de Ets1 correlaciona con una bajada de los niveles basales de VE-cadherina y con la abrogación de su inducción en respuesta a TNF. Más concretamente, el silenciamiento de Ets1 provoca una disminución de los valores de VE-cadherina a 0,2 respecto al control estimulado con TNF durante 8 h, tiempo correspondiente al punto de máxima inducción de dicha proteína (Fig. 21). Por otro lado, constatamos que el silenciamiento de VE-cadherina no afecta a la inducción de Ets1 en respuesta a TNF, lo cual indica que Ets1 actúa “*upstream*” de VE-cadherina.

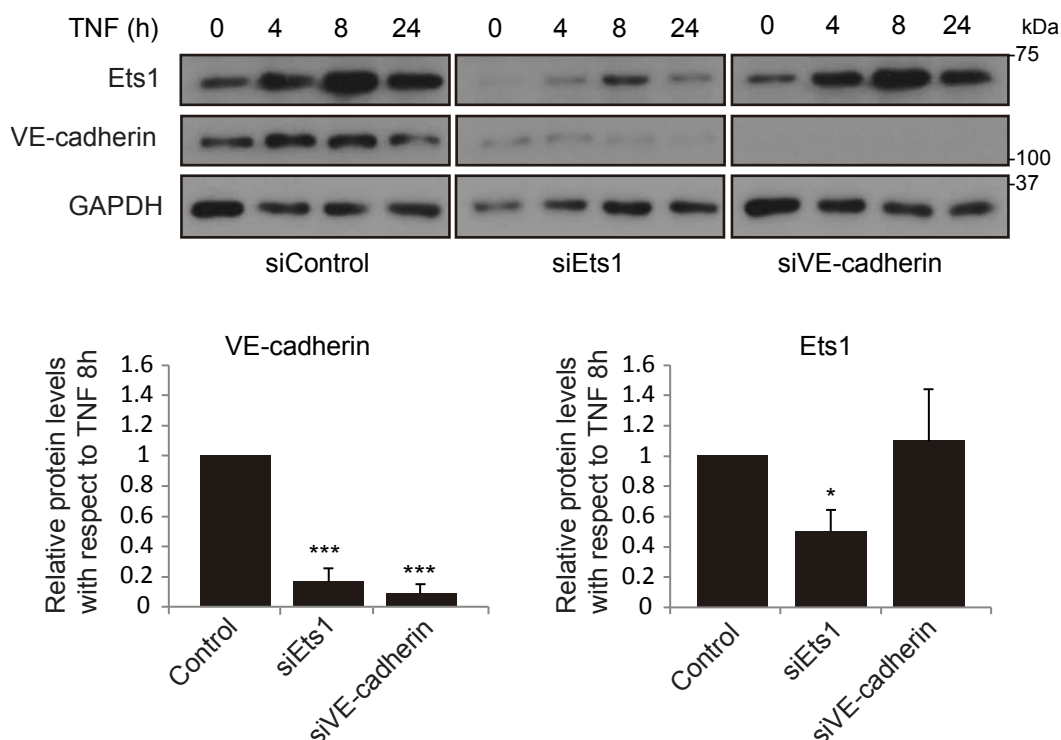


Figura 21. El silenciamiento de Ets1 con ARN de interferencia limita la inducción de VE-cadherina provocada por TNF. HUVEC fueron silenciadas para Ets1 con una mezcla de 4 ARN de interferencia y VE-cadherina con un ARN de interferencia individual y estimuladas con TNF a los tiempos indicados. Éstas fueron lisadas y los extractos obtenidos sometidos a inmunoblot con los anticuerpos correspondientes a las proteínas que se indican. Las gráficas corresponden a la media \pm SEM de 3 experimentos independientes para las proteínas indicadas en el tiempo de máxima inducción de VE-cadherina (8 h de TNF). *p-valor<0.05; *** p-valor<0.001

En conjunto, a luz de todos estos datos, podemos concluir que los niveles totales de VE-cadherina aumentan en respuesta a TNF, sobre todo a 4 y 8 h, que dicha inducción tiene lugar por la vía NF- κ B y es dependiente del factor de transcripción Ets1.

2.6. La depleción transitoria de calcio induce la degradación de VE-cadherina en células endoteliales previamente estimuladas con TNF.

Se ha demostrado en los dos apartados anteriores que el TNF induce un incremento en las tasas de degradación y síntesis de VE-cadherina, lo cual sugiere que la estimulación de células endoteliales con dicha citoquina acelera la tasa de reemplazamiento o “*turnover*” de VE-cadherina. Nos preguntamos a continuación qué efecto tiene TNF cuando se induce una disrupción masiva de las uniones intercelulares. Para ello, decidimos investigar la dinámica y estabilidad de VE-cadherina durante ensayos de “*Calcium Switch*” o depleción de calcio. En efecto, la estabilidad de los complejos de uniones dependientes de VE-cadherina radica en la existencia de uniones homofílicas dependientes de calcio entre cadherinas (Ahrens et al., 2003), por lo que la depleción de calcio favorece el desensamblaje de dichas uniones y desemboca en la internalización masiva de los complejos de uniones intercelulares (Yan et al., 2016). La reposición de calcio induce la reformación de este tipo de uniones. Así, se pueden amplificar los efectos derivados de la aceleración de la tasa de reemplazamiento de VE-cadherina gracias a la internalización masiva de dicha proteína.

Así, se realizó una depleción transitoria de calcio en HUVEC y EA.hy926 estimuladas o no con TNF durante 24 h. Observamos que, en ambos tipos celulares, los niveles totales de VE-cadherina disminuyen drásticamente tras la depleción transitoria de calcio cuando las células fueron pretratadas con TNF (Fig. 22). En HUVEC, la pre-estimulación con TNF reduce los niveles totales de VE-cadherina a menos de un 40 % respecto a los iniciales, mientras que las células no pre-estimuladas mantienen unos niveles del 70 % respecto a los iniciales, siendo esta diferencia muy significativa. Por otro lado, en células EA.hy926 los niveles de VE-cadherina tienden a permanecer constantes en células no estimuladas, mientras que en células pretratadas con TNF, éstos decrecen hasta quedar en un 65 % de los valores iniciales. Este aumento de la degradación en respuesta a la disrupción aguda de monocapa celular parece ser específica de VE-cadherina, ya que la inmunodetección en paralelo de N-cadherina no revela cambios significativos de sus niveles de expresión.

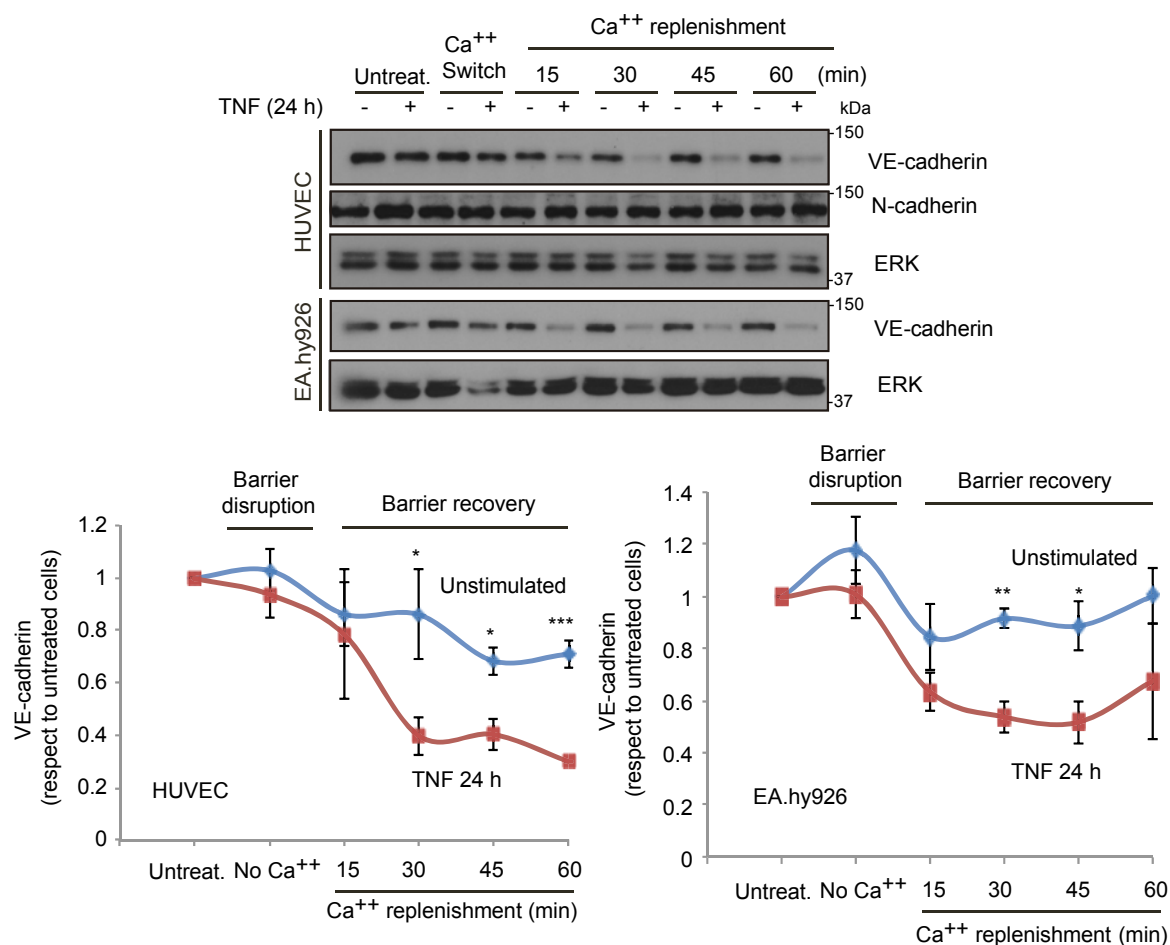


Figura 22. Los niveles totales de VE-cadherina se reducen después de una depleción de calcio en HUVEC y EAhy.926 previamente estimuladas con TNF durante 24 h. HUVEC y EAhy.926 fueron cultivadas en medio limitado en factores de crecimiento y estimuladas o no con TNF durante 24 h. Éstas fueron sometidas a un ensayo de depleción de calcio y lisadas a los tiempos indicados. Las proteínas VE-cadherina y N-cadherina fueron monitorizadas por inmunoblot. Los gráficos inferiores corresponden a la media \pm SEM de los niveles totales de VE-cadherina de 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05; **p-valor<0.01; ***p-valor<0.001.

Para observar el comportamiento de la VE-cadherina de superficie durante el *calcium switch*, realizamos una biotilación de superficie celular previa a los ensayos de depleción-reposición de calcio. De este modo, además de inmunodetectar los niveles de expresión total, pudimos de esta forma investigar en paralelo los de VE-cadherina biotilada mediante ensayos de *pull-down* con neutravidina inmovilizada.

Observamos que en células estimuladas con TNF existe una pérdida del 60 % de la VE-cadherina de superficie inicialmente marcada, mientras que en células no estimuladas, los niveles de esta población de VE-cadherina apenas varían (Fig. 23A). Por lo tanto la estimulación con TNF acorta drásticamente la vida media de la VE-cadherina de superficie tras una internalización masiva de dicha proteína provocada por la depleción de calcio. Hay que destacar también que en este tipo de experimento, tanto en células pre-estimuladas con TNF como en las no estimuladas, la degradación de la VE-cadherina total parece más acentuada que la de VE-cadherina biotilada.

Finalmente, quisimos observar el devenir de las poblaciones de VE-cadherina de superficie e intracelular durante un ensayo de depleción/repleción de calcio por microscopía confocal. Para ello, HUVEC fueron estimuladas con TNF durante 24 h, marcadas con el anticuerpo específico de VE-cadherina de superficie (BV6) y sometidas a *calcium switch*. (Fig. 23B). Observamos que la VE-cadherina inicialmente en superficie desaparece según transcurre el tiempo de repleción de calcio, lo que concuerda con la disminución observada en los experimentos de biotinilación (Fig. 23A). Además, observamos que la VE-cadherina presente en las uniones intercelulares se mantiene a lo largo de la reposición de calcio, disminuyendo sin embargo la población intracelular de la misma. Estos datos sugieren que la población intracelular de VE-cadherina podría actuar como reservorio capaz de reemplazar la VE-cadherina de superficie que se pierde a lo largo del tiempo.

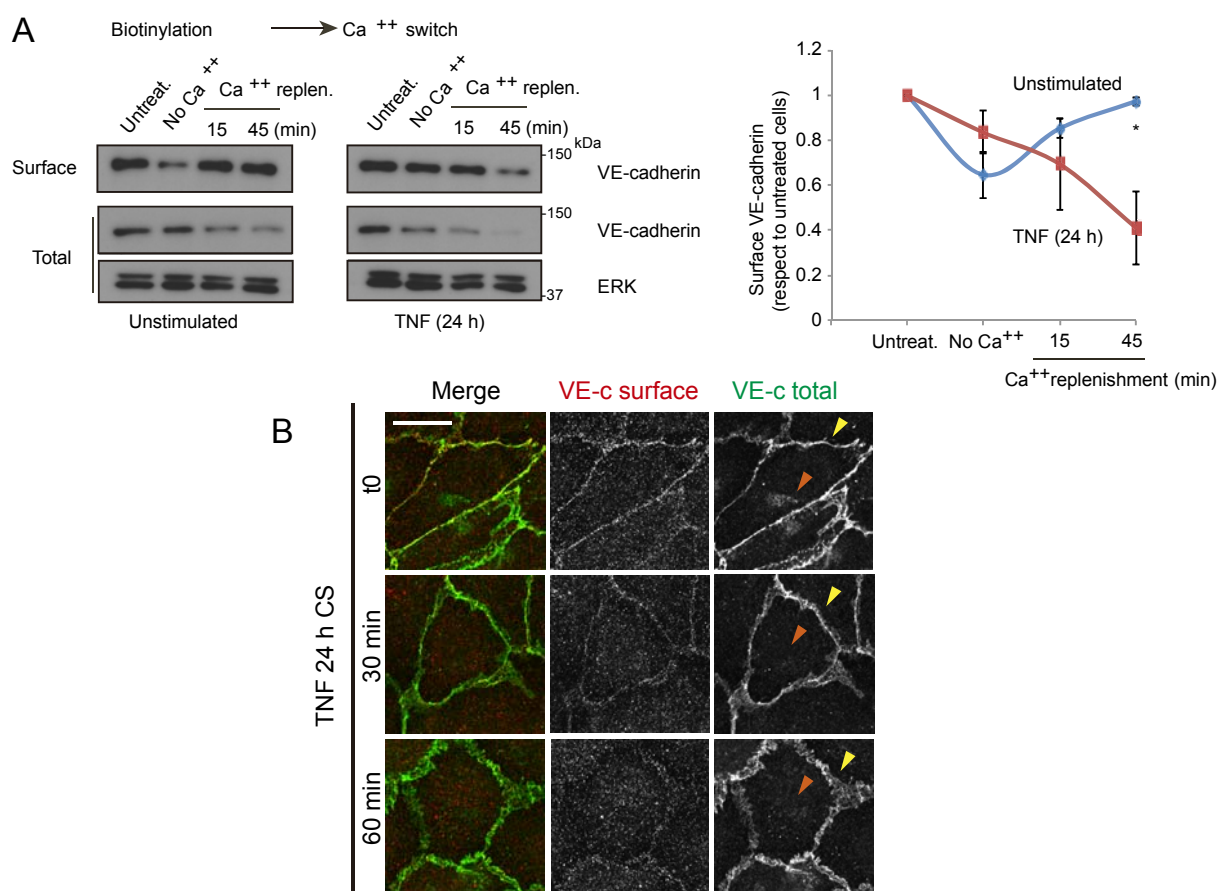


Figura 23. La vida media de la población de VE-cadherina de superficie se acorta en células estimuladas con TNF durante 24h después de una depleción de calcio y la población intracelular de VE-cadherina tiende a desaparecer. (A) HUVEC fueron estimuladas o no con TNF durante 24 h. Éstas fueron biotiniladas en superficie, sometidas a un ensayo de depleción de calcio y lisadas a los tiempos indicados. Los extractos obtenidos fueron sometidos a ensayos de *pull-down* con neutravidina-agarosa y procesados por inmunoblot para observar los niveles de VE-cadherina. El gráfico de la derecha corresponde a la media \pm SEM de 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05. (B) HUVEC fueron estimuladas con TNF durante 24 h, marcadas con un anticuerpo específico de la población de VE-cadherina de superficie celular (BV6), sometidas posteriormente a un ensayo de depleción/reposición de calcio con 30 y 60 min de recuperación y fijadas. La VE-cadherina total y la VE-cadherina marcada en superficie antes del ensayo fueron observadas por microscopía confocal. Las flechas muestran las dos poblaciones de VE-cadherina visualizadas mediante el anticuerpo que reconoce la cantidad total de dicha proteína (amarillas: superficie; naranjas: intracelular). Barra de escala 20 μ m.

2.7. Los niveles de VE-cadherina en la superficie celular se mantienen constantes a lo largo de una depleción transitoria de calcio.

Habiendo observado que la vida media de la VE-cadherina que se encuentra inicialmente en la superficie celular se acorta drásticamente en células estimuladas con TNF y sometidas a un ensayo de depleción de calcio, y observado que los niveles de superficie no parecen alterarse por microscopía confocal, quisimos investigar cuantitativamente los niveles de la VE-cadherina que se encuentra en la superficie celular a lo largo de todo el proceso de depleción-reposición de calcio. Para ello, invertimos el orden del experimento y realizamos primero el *calcium switch* y tras cada periodo de incubación llevamos a cabo la biotinilación y el subsiguiente ensayo de *pull-down*.

En línea con las observaciones realizadas por microscopía confocal (Fig. 23B), observamos que, aunque los niveles de superficie de VE-cadherina sufren una reducción transitoria a tiempos tempranos de reposición de calcio, éstos se recuperan a los niveles iniciales a tiempos más tardíos, tanto en células no estimuladas como en las estimuladas con TNF durante 24 h (Fig. 24). En el caso de las células pretratadas con la citoquina, observamos un claro contraste entre el comportamiento de VE-cadherina de superficie y el de VE-cadherina total que incrementa su degradación, sobre todo 120 min después de añadir de nuevo el medio con calcio. Comparando con los experimentos de marcaje de superficie antes del *calcium switch*, en los cuales observamos que a partir de los 45 min de la reposición de calcio existe una reducción notable del conjunto de moléculas de VE-cadherina que se encuentran inicialmente en la superficie (Figura 23), estos experimentos indican claramente que la VE-cadherina detectada en la superficie en la Fig. 24 proviene de otro conjunto de moléculas de cadherina presente en el interior celular, el cual no se ve sometido a la degradación inducida por el *calcium switch*. Además, cuando monitorizamos la resistencia eléctrica transendotelial (TEER) mediante el sistema ECIS, observamos que la recuperación de la función de barrera es comparable entre HUVEC no estimuladas y estimuladas con TNF durante 24 h (Fig. 24B), lo que concuerda con un mantenimiento de los niveles de VE-cadherina en la superficie en células pretratadas con TNF.

Además, decidimos emplear una estrategia adicional que nos permitiera estudiar si la VE-cadherina presente en la superficie celular formaba parte de complejos de uniones adherentes funcionales. En efecto, p120-catenina es una proteína cuya interacción con VE-cadherina es necesaria para conferir estabilidad y funcionalidad a los complejos de uniones adherentes (Herron et al., 2011). Por tanto, decidimos inmunoprecipitar p120-catenina antes y después de una depleción de calcio en HUVEC estimuladas o no con TNF durante 24h (Fig. 24C). Observamos que, después de la depleción de calcio, tanto en células estimuladas como no estimuladas con TNF durante 24 h, los niveles de VE-cadherina asociada a p120-catenina no disminuyen. De nuevo, 45 min después de reponer el calcio en el medio, los niveles totales de VE-cadherina en el ensayo disminuyen en las células pretratadas con TNF.

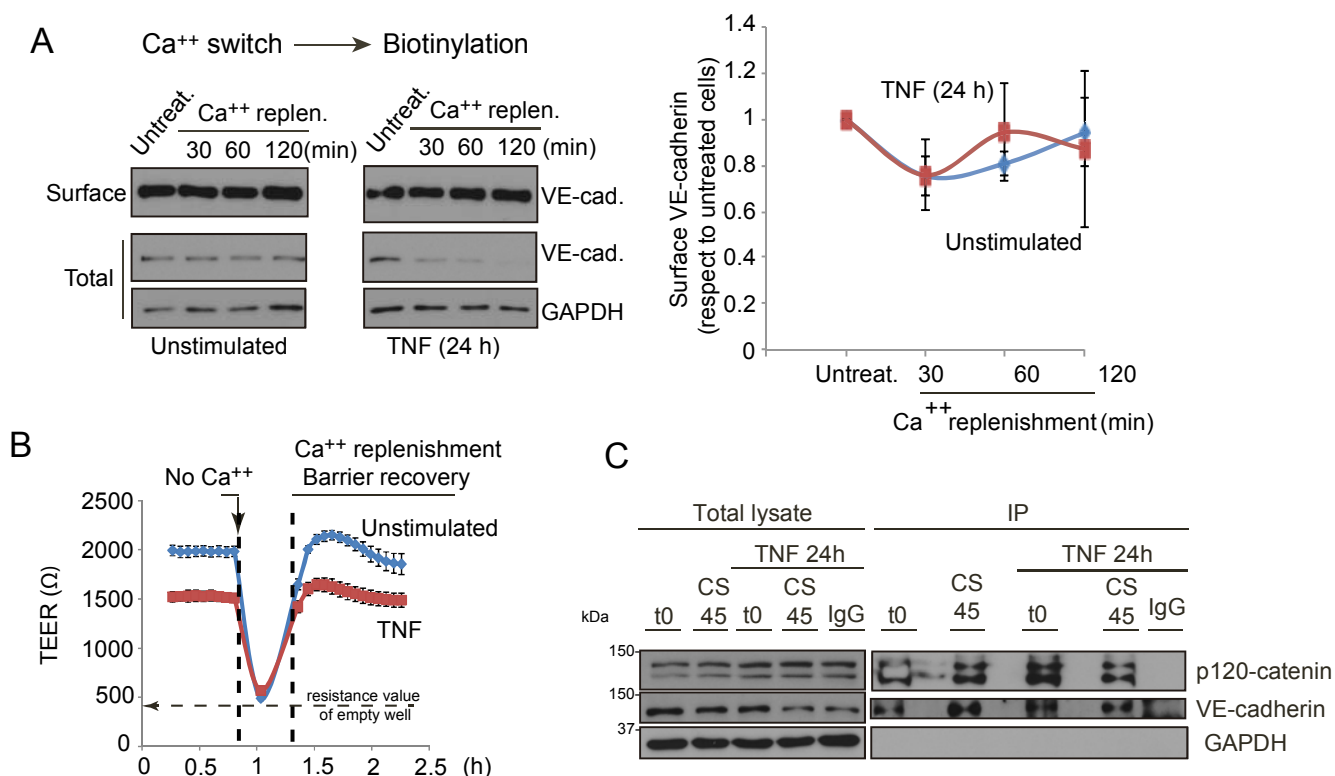


Figura 24. Los niveles de VE-cadherina en la superficie de HUVEC se mantienen constantes a lo largo de una cinética de depleción-reposición de calcio (Biotinilación y *Pull-Down*). (A) HUVEC fueron estimuladas o no con TNF durante 24 h. Éstas fueron sometidas a un ensayo de depleción de calcio con los tiempos de recuperación post-depleción que se indican, biotiniladas en su superficie y lisadas a los tiempos indicados. Los extractos obtenidos fueron sometidos a ensayos de *pull-down* con neutravidina-agarosa y los niveles de VE-cadherina monitorizados por inmunoblot. El gráfico de la derecha muestra la media \pm SEM de los niveles de superficie de VE-cadherina en 3 experimentos independientes. (B) La TEER de monocapas de HUVEC previamente estimuladas o no con TNF durante 24 h fue monitorizada gracias al sistema ECIS. Se muestra la ventana de tiempo correspondiente a un ensayo de *calcium switch* de una media \pm SEM de dos experimentos independientes. (C) HUVEC fueron estimuladas o no con TNF durante 24 h. Éstas fueron sometidas o no a un ensayo de depleción de calcio con 45 min de recuperación post-depleción, lisadas y sometidas a una inmunoprecipitación con un anticuerpo específico contra p120-catenina.

Finalmente, empleamos una última estrategia experimental para monitorizar los niveles de VE-cadherina presentes en la superficie celular a lo largo de una cinética de *calcium switch* utilizando el anticuerpo específico BV6 (Fig. 25). Observamos, en línea con los experimentos anteriores, que tanto en HUVEC no estimuladas como pre-estimuladas con TNF durante 24 h, los niveles de superficie de VE-cadherina no presentan diferencias significativas a lo largo de la cinética de depleción-reposición de calcio.

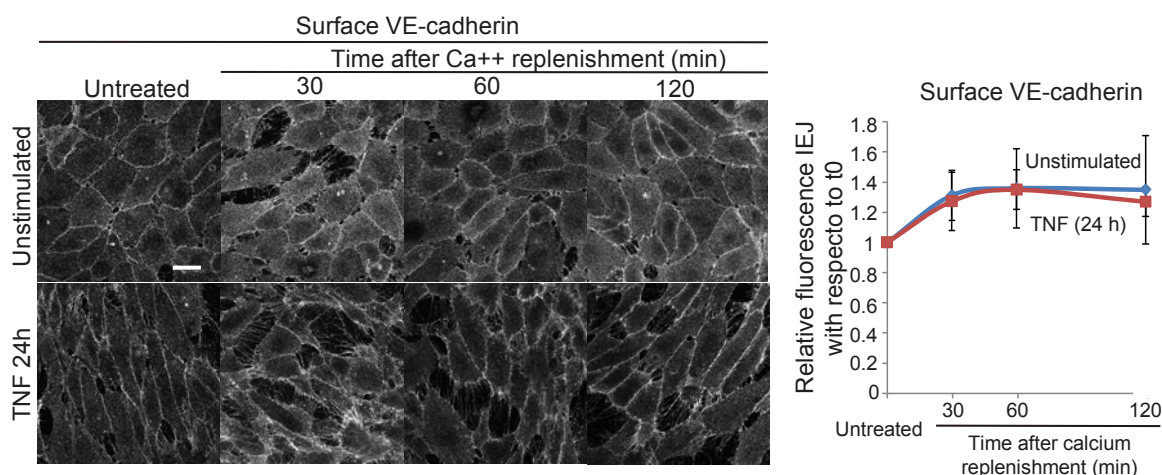


Figura 25. Los niveles de VE-cadherina en la superficie de HUVEC se mantienen constantes a lo largo de una cinética de depleción-reposición de calcio (marcaje con anticuerpo específico de VE-cadherina de superficie celular). Las HUVEC fueron estimuladas o no con TNF durante 24 h. Éstas fueron sometidas a un ensayo de depleción de calcio con los tiempos de recuperación post-depleción que se indican, marcadas en su superficie con un anticuerpo específico de VE-cadherina (BV6), fijadas y sometidas a inmunofluorescencia. Barra de escala 20 μm . El gráfico de la derecha muestra la media \pm SEM de los niveles de superficie de VE-cadherina de 3 experimentos independientes.

En conjunto, estos datos indican que, aunque tras una depleción de calcio se reduzcan drásticamente los niveles totales de VE-cadherina, así como los inicialmente presentes en la superficie, las células pretratadas con TNF tienen mecanismos para reemplazar y mantener constante la población de superficie de esta proteína, así como para mantener su funcionalidad en cuanto a su grado de asociación con p120-catenina, que no disminuye, o en cuanto a la capacidad para reformar la monocapa endotelial tras la depleción y reposición de calcio en el medio.

3. LA PROTEÍNA BST-2 SE INDUCE EN RESPUESTA A TNF Y REGULA LA DINÁMICA DE VE-CADHERINA

A lo largo de los experimentos anteriores, hemos observado que la estimulación de células endoteliales HUVEC con TNF induce un aumento de la degradación y la síntesis de VE-cadherina, lo cual acelera la tasa de reemplazamiento de esta proteína, manteniendo sin embargo constantes sus niveles en la superficie celular. Este fenómeno se hace más evidente después de una disrupción aguda de los complejos adherentes mediante depleción y reposición de calcio. En efecto, a pesar de provocarse una reducción drástica de los niveles totales de VE-cadherina, existe una fuente intracelular de esta proteína que mantiene constantes los niveles de superficie de la misma.

Llegados a este punto, hipotetizamos que las células endoteliales expuestas a citoquinas inflamatorias como TNF deben expresar maquinaria proteica en la superficie celular o en las uniones intercelulares que regule la homeostasis de VE-cadherina.

3.1. La estimulación de HUVEC con TNF modula la expresión y localización de proteínas en la superficie celular.

En este sentido, con el objetivo de identificar nuevas proteínas en la superficie endotelial implicadas en la regulación de la permeabilidad y el mantenimiento de la integridad del endotelio vascular, llevamos a cabo un experimento que consistió en la estimulación de 25 millones de HUVEC por punto experimental con TNF durante 0 y 24 h, seguida de un marcaje con Sulfo-NHS-Biotina en su superficie. Posteriormente, las células fueron lisadas y sometidas a un ensayo de *pull-down* con estreptavidina-agarosa. Las muestras obtenidas se corrieron en geles de poliacrilamida, realizándose seguidamente un análisis proteómico por espectrometría de masas (LC/MS-MS) en colaboración con la Dra. Severine Gharbi (servicio proteómica, CNB-CSIC). Una tinción con plata de un gel preparativo de SDS-PAGE reveló que TNF no indujo cambios significativos en el patrón de expresión total de proteína, mientras que sí lo hizo en el caso de la fracción de proteínas de superficie biotiniladas purificadas mediante ensayo de *pull-down* con neutravidina agarosa. Así, constatamos que la localización en superficie de una serie de proteínas se veía alterada (incrementada o disminuida) en respuesta a TNF (Fig. 26). El análisis proteómico dio lugar a la identificación de varias proteínas de membrana conocidas por tener su expresión incrementada por TNF tales como antígenos de histocompatibilidad HLA, ICAM-1, VCAM-1, E-selectina o CD44 (datos no mostrados) (Keller et al., 2011; Franzén et al., 2003; Li et al., 2012). Otras, cuya regulación por TNF es más sutil, como Jagged1, también fueron identificadas (Viemann et al., 2004 y 2006; Lim y Lappas, 2015). Entre ellas además identificamos cuatro proteínas potencialmente implicadas en el tráfico intracelular y la regulación de las uniones intercelulares y la respuesta inflamatoria, como son Eps15 homology domain 1 (EHD1) (Rapaport et al., 2006), la proteína tirosina fosfatasa de tipo receptor kappa (RPTPk), relacionada con la proteínas VE-PTP, que regula la estabilidad de la VE-cadherina (Nottebaum et al., 2008; Beltran y Bixby, 2003), Robo1 (Yang et al., 2015; Zhao et al., 2014) y CD317 o BST-2, proteína regulada en la respuesta a interferón, más tarde renombrada como tetherina e investigada como factor de restricción viral (Neil et al., 2008; Li et al., 2016). Los cambios de expresión de estas proteínas fueron validados por

PCR cuantitativa con dos pares de *primers* para cada gen, utilizando el transcrito de ICAM-1 como control positivo de genes cuya expresión se regula de diez a cien veces y Jagged1 para aquellos cuya expresión se regula menos de diez veces en células endoteliales (Fig. 27).

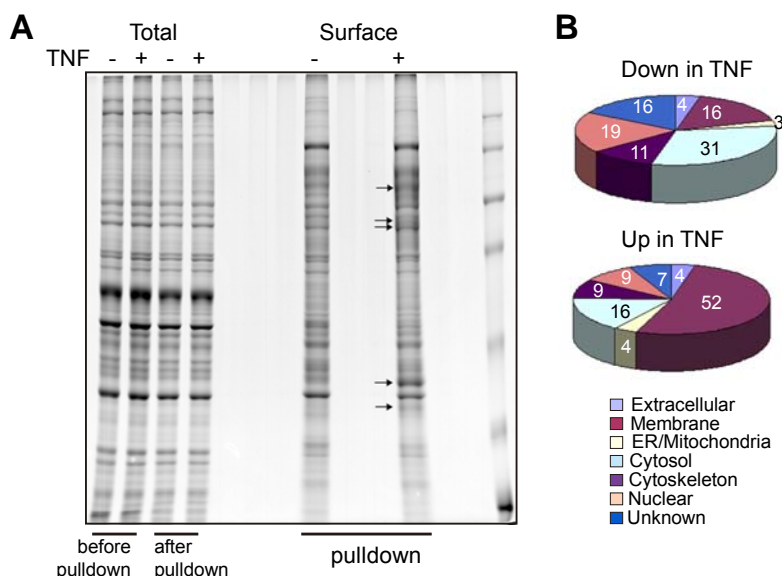


Figura 26. Identificación por análisis proteómico de nuevas proteínas endoteliales cuya localización en superficie se ve alterada en respuesta a TNF. (A) HUVEC fueron estimuladas o no con TNF durante 24 h. Éstas fueron marcadas en superficie con Sulfo-NHS-Biotina, lisadas y sometidas a un ensayo de pull-down con Estreptavidina-agarosa. Las muestras obtenidas se corrieron en geles de poliacrilamida y se revelaron una tinción de plata. Las flechas indican las bandas correspondientes a proteínas cuyos niveles aumentan en superficie en respuesta a TNF. (B) Posteriormente se realizó un análisis proteómico por espectrometría de masas de las bandas obtenidas (LC/MS-MS), obteniéndose una serie de proteínas cuya expresión en superficie aumentaba o disminuía en HUVEC estimuladas con TNF. Se muestra el número de proteínas identificadas así como su localización putativa.

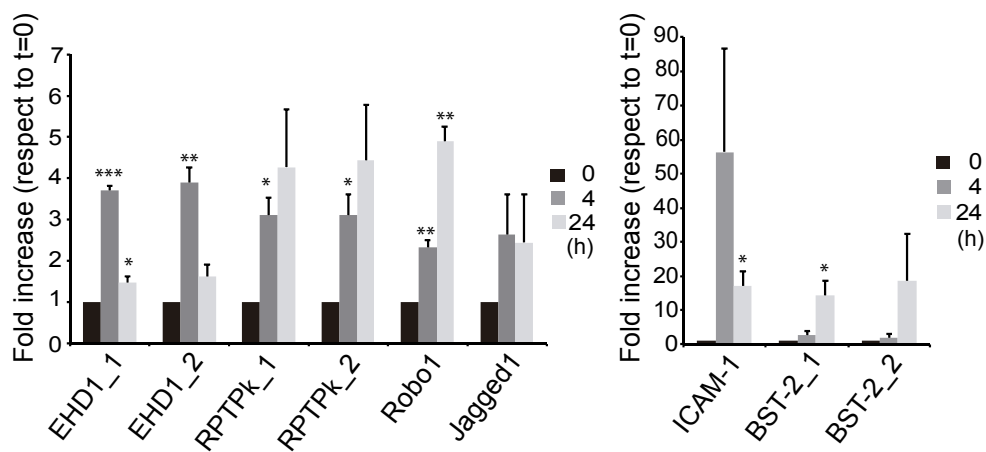


Figura 27. TNF regula transcripcionalmente los niveles de varias proteínas cuya expresión aumenta en superficie de HUVEC. HUVEC fueron estimuladas con TNF durante 0, 4 y 24 h. Éstas fueron lisadas con trizol con el fin de purificar su ARN mensajero y someterlo a una reacción de PCR cuantitativa. Los gráficos muestran la media \pm SEM de los niveles relativos del ARN mensajero de 3 experimentos diferentes para las proteínas indicadas. * P-valor < 0.05.

3.2. El silenciamiento de BST-2 correlaciona con una bajada de los niveles de VE-cadherina.

Como método de criba para saber si las proteínas identificadas desempeñaban un papel importante en la regulación de VE-cadherina, decidimos silenciarlas una por una con ARN de interferencia y monitorizar los niveles totales de VE-cadherina (Fig. 28). Nos centramos en BST-2 ya que observamos que su silenciamiento con tres ARN de interferencia distintos inducía un descenso significativo de los niveles de VE-cadherina del orden del 50%, mientras que el silenciamiento con ARN de interferencia control o con ARN de interferencia frente a otras proteínas de expresión reguladas por TNF, como RPTP κ o RhoB no inducía cambios significativos en la expresión de esta cadherina.

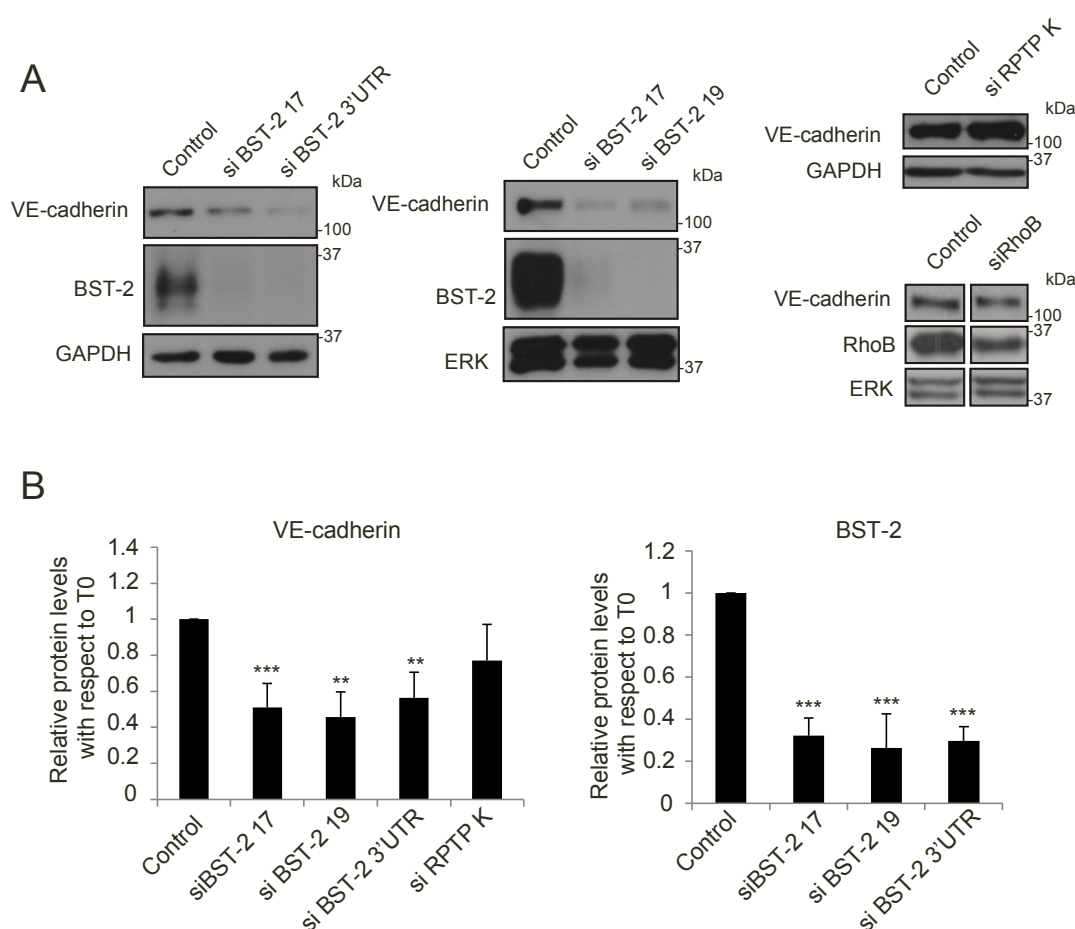


Figura 28. El silenciamiento de BST-2 correlaciona con un descenso significativo de los niveles totales de VE-cadherina. (A) HUVEC fueron silenciadas con ARN de interferencia para las proteínas indicadas, estimuladas con TNF durante 24 h (7 h en el caso del silenciamiento de RhoB) y lisadas. Las proteínas que se indican fueron monitorizadas por inmunoblot. (B) Cuantificación correspondiente a los niveles totales de VE-cadherina y BST-2 en los silenciamientos indicados. Los experimentos se realizaron un mínimo de 6 veces para los silenciamientos de BST-2 y de 3 veces para las demás proteínas. ** p-valor<0.01; ***p-valor<0.001.

3.3. La proteína BST-2 aumenta sus niveles totales en respuesta a TNF en HUVEC y HCMEC/D3.

Con el fin de estudiar si el aumento de expresión del ARN mensajero de BST-2 en respuesta a TNF se correspondía con un aumento de los niveles totales de dicha proteína, decidimos realizar cinéticas de estimulación con TNF (a 0, 4, 8 y 24 h) en HUVEC y HCMEC/D3 (Fig. 29). Observamos que los niveles de BST-2 aumentan significativamente en ambos tipos celulares. Más concretamente, en HUVEC, dichos niveles aumentan paulatinamente a lo largo la cinética de TNF hasta alcanzar un valor de 6 –comparado con el control no estimulado- y en células HCMEC/D3 observamos un incremento de hasta 2 veces en comparación con el control no estimulado.

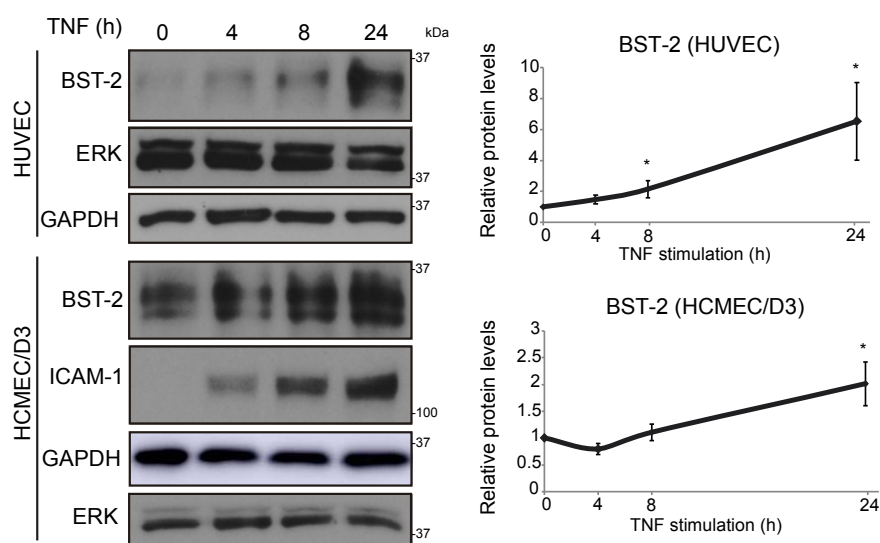


Figura 29. La proteína BST-2 aumenta sus niveles en respuesta a TNF en HUVEC y HCMEC/D3. HUVEC o HCMEC/D3 fueron estimuladas con TNF durante 0, 4, 8 ó 24 h, lisadas y las proteínas indicadas monitorizadas por inmunoblot. Las gráficas de la derecha muestran la media \pm SEM de los niveles de BST-2 correspondientes a 3 experimentos independientes para cada uno de los tipos celulares. *p-valor<0.05.

3.4. Las proteínas BST-2 y VE-cadherina colocalizan parcialmente en HUVEC.

Teniendo en cuenta que la proteína BST-2 se induce en respuesta a TNF y que su depleción correlaciona con una disminución de los niveles totales de VE-cadherina en HUVEC, decidimos estudiar la distribución de ambas proteínas. Para ello, realizamos cinéticas de 0, 4, 8 y 24 h de TNF en HUVEC (Fig. 30) y observamos que BST-2 se localiza formando una conspicua población intracelular situada a nivel de la red trans-Golgi (TGN) y colocaliza parcialmente con la población intracelular de VE-cadherina. Además, una pequeña fracción de BST-2 también aparece, aunque de manera más discreta, adyacente a la proteína VE-cadherina situada a nivel de las uniones intercelulares.

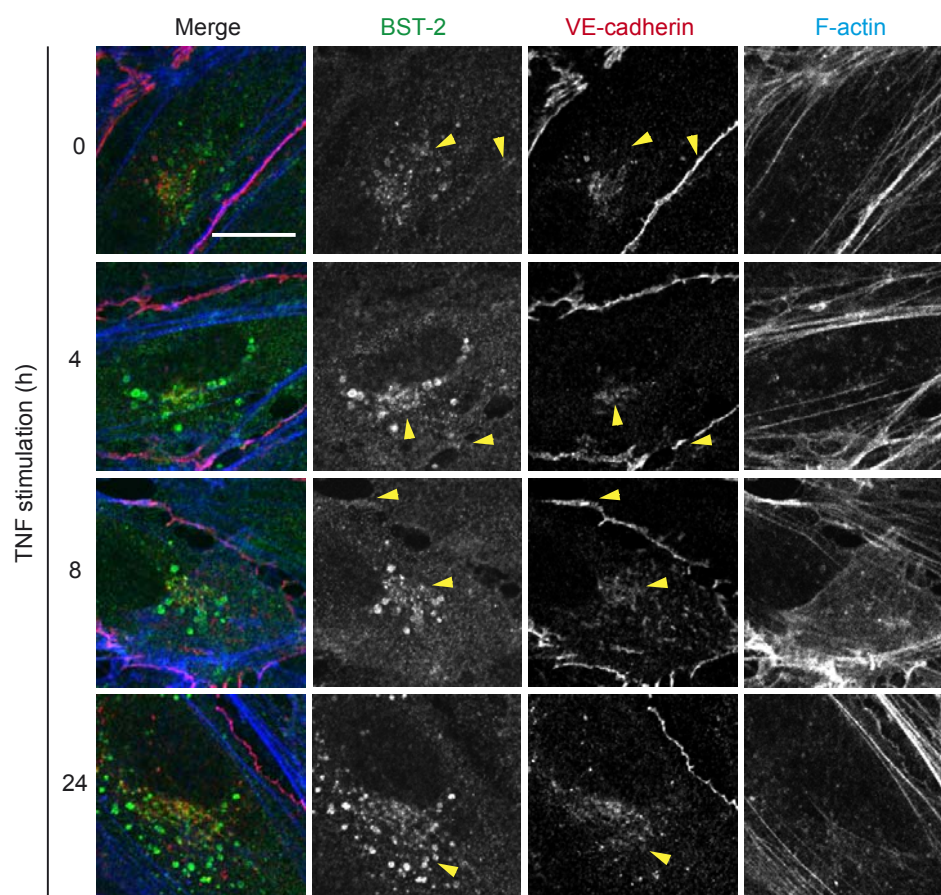


Figura 30. Localización subcelular de BST-2 y VE-cadherina en HUVEC. HUVEC fueron estimuladas con TNF durante 0, 4, 8 ó 24 h, fijadas y teñidas para la observación de BST-2, VE-cadherina y F-actina por microscopía confocal. Las flechas amarillas indican las distintas poblaciones de BST-2. Barra de escala 20 μ m.

3.5. Las proteínas BST-2 y VE-cadherina se localizan en distintos dominios vesiculares.

Una vez observada la colocalización parcial de BST-2 y VE-cadherina, quisimos profundizar en su posible interacción mediante el empleo de la microscopía de superresolución STED. Para ello, realizamos una depleción de calcio en HUVEC previamente estimuladas con TNF durante 24 h y las fijamos a 0, 60 y 120 min después de la reposición de calcio. De este modo, de haber una interacción entre BST-2 y VE-cadherina, podríamos detectarla con mayor facilidad por cuanto habremos inducido una internalización masiva de VE-cadherina (Fig. 31). Gracias a esta técnica, pudimos observar que VE-cadherina y BST-2, a pesar de encontrarse en estrecha proximidad, no se encontraban en los mismos dominios vesiculares. Estos datos están en consonancia con los resultados obtenidos en inmunoprecipitaciones de BST-2, en las cuales no co-inmunoprecipitaba VE-cadherina (datos no mostrados). En conjunto, estos datos sugieren que la relación entre BST-2 y VE-cadherina no radica en una interacción directa entre ambas.

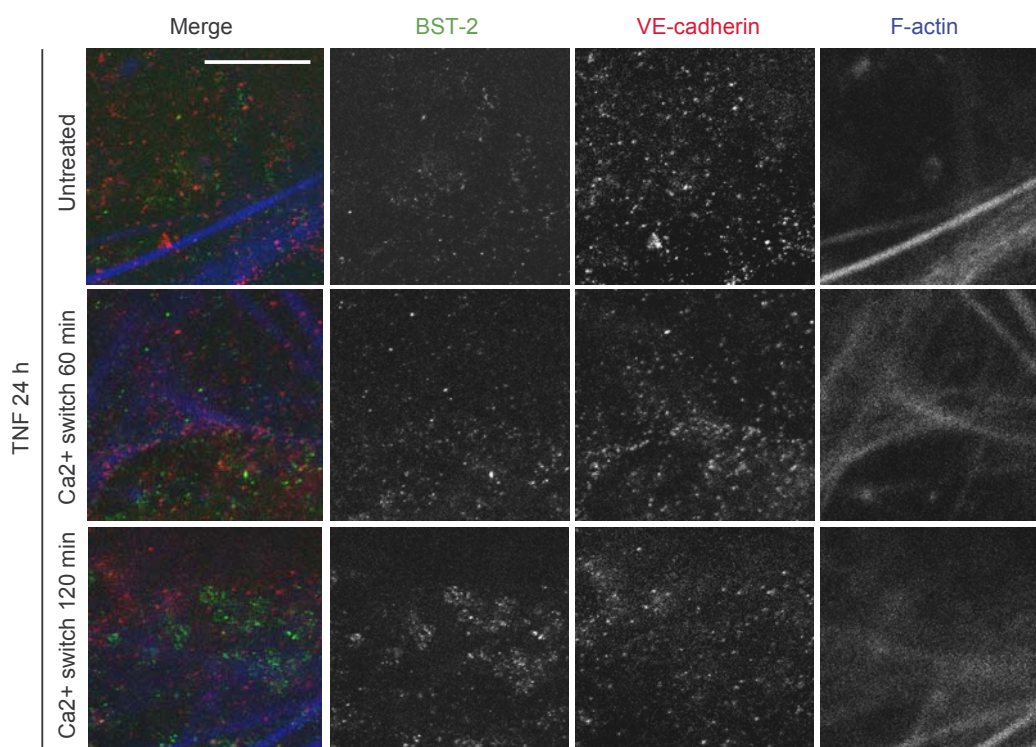


Figura 31. Localización subcelular de BST-2 y VE-cadherina en HUVEC por microscopía de superresolución STED. HUVEC fueron estimuladas con TNF durante 24 h, sometidas o no a un ensayo de depleción de calcio con tiempos de recuperación de 60 y 120 min, fijadas y teñidas para la observación de BST-2, VE-cadherina y F-actina por inmunofluorescencia en un microscopio de superresolución. Barra de escala 10 μ m.

3.6. La reducción de los niveles de BST-2 mediante la expresión de la proteína Vpu correlaciona con una reducción de los niveles de superficie de VE-cadherina.

Con el fin de caracterizar más en profundidad la disminución de los niveles de VE-cadherina al silenciar BST-2 en HUVEC, decidimos emplear una estrategia complementaria para reducir los niveles celulares de BST-2. Ésta consistió en la transfección de HUVEC con Vpu, proteína antagonista de BST-2. En efecto, Vpu es un factor expresado por el VIH cuya función es la de inducir la ubiquitinación y secuestro de BST-2, redirigiendo dicha proteína hacia una ruta degradativa y disminuyendo por tanto sus niveles totales (Douglas et al., 2009; Van Damme et al., 2008).

Observamos que, en el caso de las células transfectadas con VpuGFP, la expresión de BST-2 se reduce y su localización cambia, apareciendo en acumulaciones intracelulares positivas para VpuGFP. Además, los niveles de VE-cadherina situada a nivel de las uniones adherentes en estas células son significativamente inferiores a los de las células transfectadas con GFP, lo cual corrobora los datos obtenidos por silenciamiento por ARN de interferencia (Fig. 32). Sin embargo, Vpu no colocaliza con VE-cadherina. Así, esta nueva aproximación experimental, apoya la hipótesis de que el papel de BST-2 en el mantenimiento de los niveles de VE-cadherina no se basa en una interacción directa entre

ambas proteínas y/o la redirección de VE-cadherina hacia un compartimento endolisosomal.

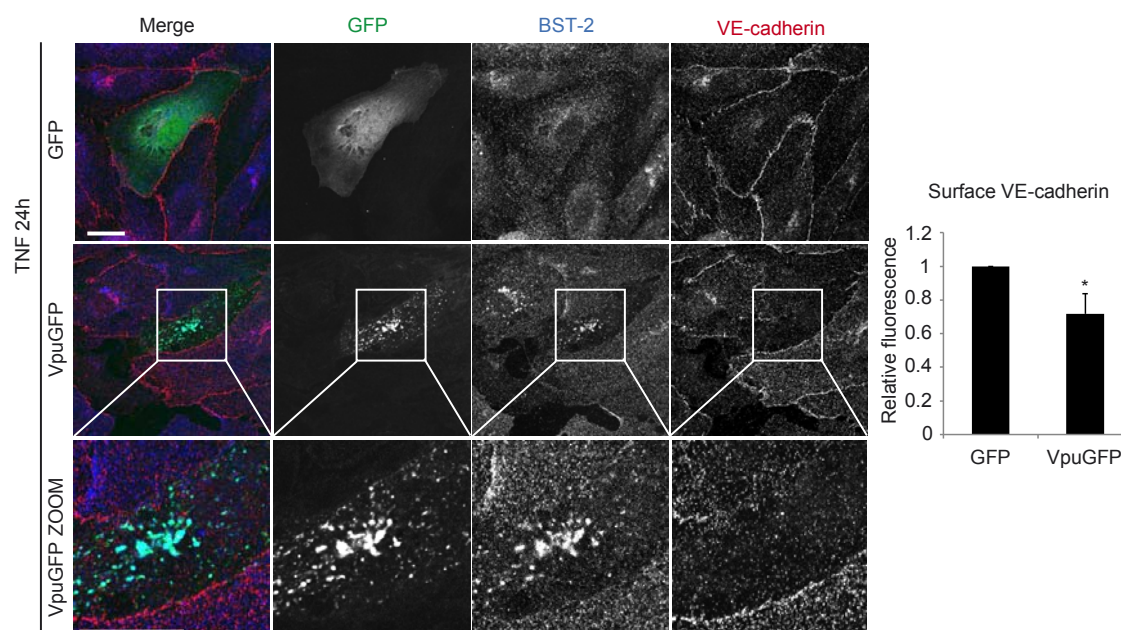


Fig. 32. La transfección de Vpu en HUVEC correlaciona con una disminución de los niveles de VE-cadherina en la superficie celular. HUVEC fueron transfectadas con las construcciones GFP o VpuGFP, estimuladas con TNF durante 24 h, fijadas y teñidas para observar las proteínas GFP, BST-2 y VE-cadherina por inmunofluorescencia. La gráfica de la derecha muestra la cuantificación correspondiente a la media \pm SEM de la intensidad de fluorescencia de la VE-cadherina de superficie en al menos 10 células por condición en 5 experimentos independientes. *p-valor<0.05. Barra de escala 20 μ m.

3.7. Los dominios YxY, STS y anclaje GPI de BST-2 están implicados en el mantenimiento de los niveles de superficie de VE-cadherina en HUVEC.

Habiendo observado que la depleción de BST-2 reduce los niveles totales de VE-cadherina, aunque sin interaccionar directamente con ella, decidimos estudiar qué dominios de la proteína BST-2 podían estar implicados en la regulación de los niveles de VE-cadherina en HUVEC.

Para ello, transfectamos en HUVEC una batería de construcciones de BST-2 fusionada al epítipo FLAG y mutadas en diferentes dominios, generadas en el laboratorio de la Dra. Clarisse Berlioz-Torrent (Institut Cochin, INSERM, París). Observamos que mutando los dominios YxY a AxA, STS a AAA, ambos dominios a la vez o truncando la proteína para que no pueda añadirse el anclaje GPI, los niveles de superficie de VE-cadherina se reducen significativamente entre un 15 y un 25 % (Fig. 33). En efecto, se ha descrito que el dominio YxY está implicado en la señalización por NF- κ B y en la interacción con AP1 (Rollason et al. 2007; A. Tokarev et al. 2013), por lo que hipotetizamos que podría mediar la inducción de Ets1, probablemente vía TAK1 (Tokarev et al., 2013). Por otro lado, el dominio STS está implicado en la ubiquitinación por Vpu y la redirección de BST-2 hacia una ruta degradativa, lo cual sugiere que la localización BST-2 podría influir en el fenómeno regulatorio (Tokarev et al., 2011). Finalmente, sabiendo que el anclaje GPI de

BST-2 está implicado en la estructuración de balsas lipídicas (Billcliff et al. 2013; Rollason et al. 2009) y que la VE-cadherina que forma contactos estables tiende a localizarse en dominios ricos en balsas lipídicas (Baumgartner et al., 2014), podemos hipotetizar que BST-2 podría jugar un papel importante no sólo en la síntesis y la salida de VE-cadherina hacia la superficie celular, si no también en la estabilización de los complejos de VE-cadherina que forman uniones intercelulares en la membrana plasmática. Las construcciones cuya transfección no indujo un cambio en los niveles de VE-cadherina de superficie corresponden a mutaciones de diferentes regiones del ectodominio de BST-2. Estas regiones están implicadas en la dimerización, tetramerización y glicosilación de BST-2. Concluimos que estas funciones no parecen ser esenciales para el mantenimiento de los niveles de VE-cadherina.

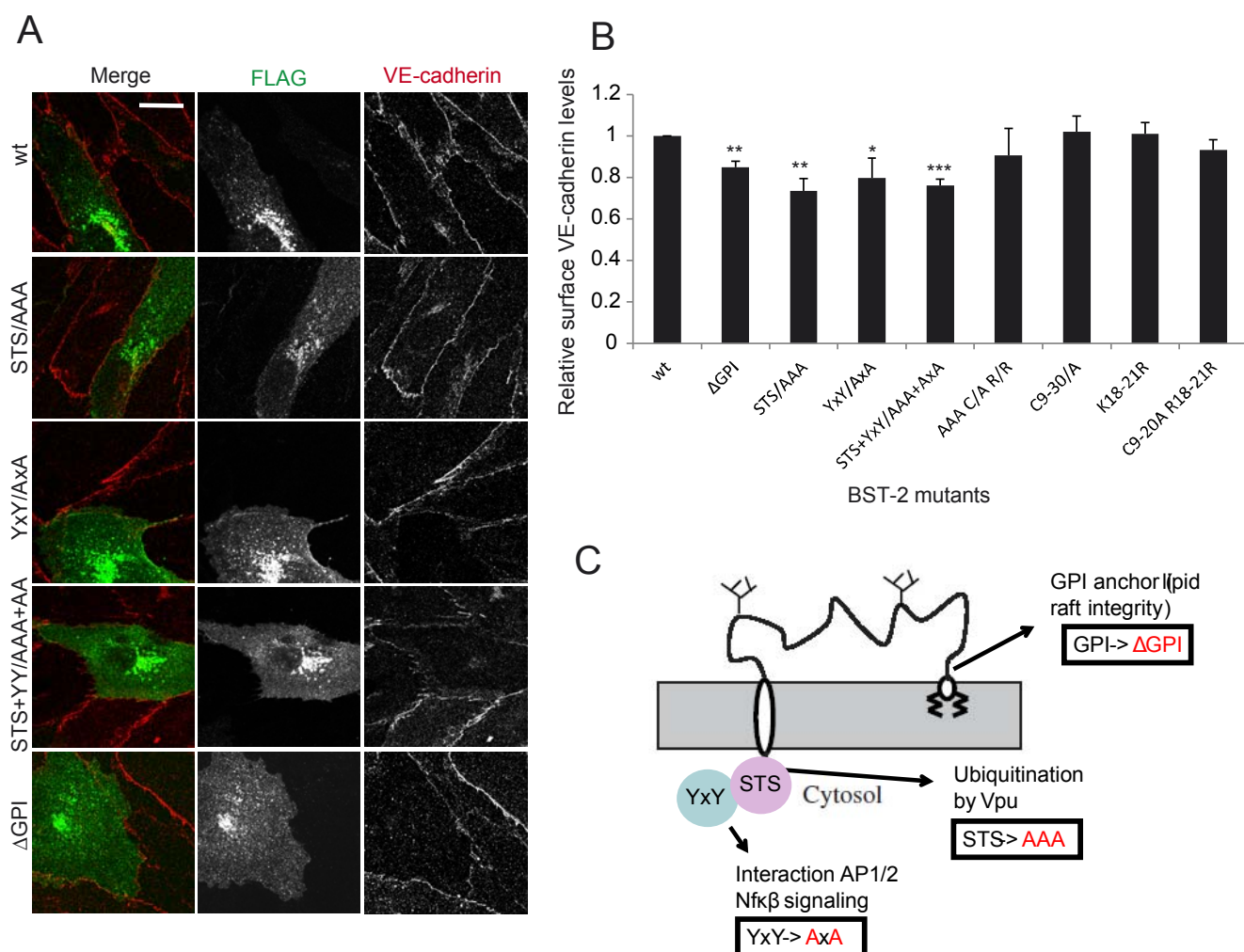


Figura 33. La mutación de los dominios YxY, STS y anclaje GPI de BST-2 provoca un descenso de la cantidad de VE-cadherina en la superficie de HUVEC. (A) HUVEC fueron transfectadas durante 48 h con plásmidos codificando para la proteína BST-2-FLAG o BST-2-FLAG mutada en los dominios que se indican, fijadas y sometidas a inmunofluorescencia para observar las proteínas derivadas de las construcciones BST-2-FLAG transfectadas, así como VE-cadherina endógena. Barra de escala 20 μ m. (B) Cuantificación correspondiente a la media \pm SEM de la proteínas VE-cadherina de superficie en las células transfectadas con las construcciones que se indican. Se contó un mínimo de 10 células por transfección en 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05; **p-valor<0.01. (C) Esquema correspondiente a la estructura de la proteína BST-2 y la localización de los tres dominios cuya mutación indujo una reducción de los niveles de superficie de VE-cadherina.

3.8. BST-2 regula los niveles de Ets1.

Habiendo observado que el dominio YxY de BST-2, capaz de inducir señalización NF- κ B, es necesario para mantener los niveles de VE-cadherina, y que Ets1, factor de transcripción de VE-cadherina, se induce también por la vía NF- κ B, decidimos investigar si BST-2 pudiera estar regulando de algún modo la inducción de Ets1. Primero, quisimos investigar si Ets1 y BST-2 pudieran interactuar en HUVEC. Para ello, realizamos cinéticas de TNF a 0, 8 y 24 h y no observamos ninguna co-localización manifiesta entre ambas proteínas (Fig. 34), lo cual concuerda con inmunoprecipitaciones de BST-2 en las que no se co-inmunoprecipitó Ets1 (datos no mostrados).

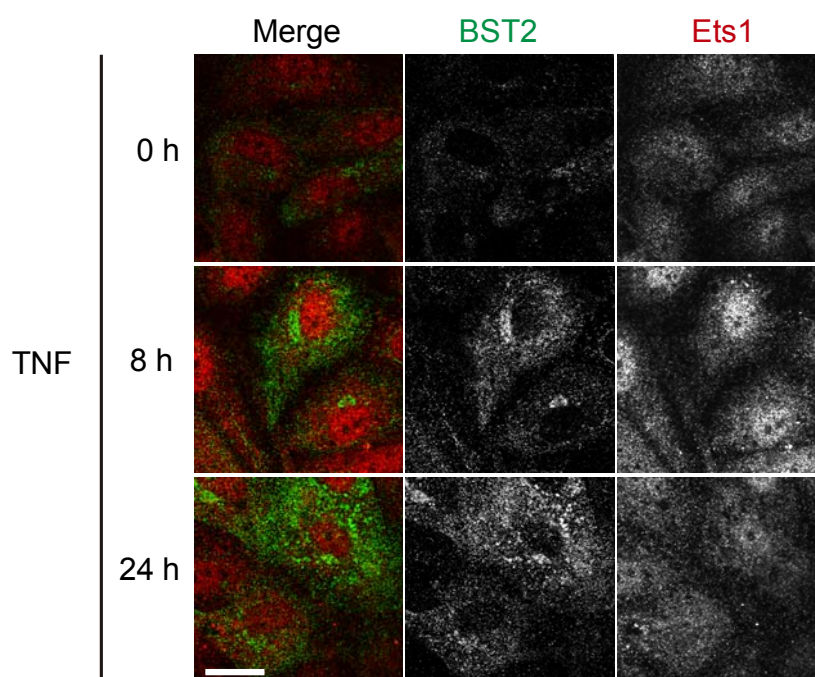


Figura 34. BST-2 y Ets1 no co-localizan en HUVEC. HUVEC fueron estimuladas con TNF durante 0, 8 y 24 h, fijadas y sometidas a inmunofluorescencia con anticuerpos específicos para la observación de BST-2 y Ets1. Barra de escala 20 μ m.

Por lo tanto, hipotetizamos que la relación entre ambas podía no reposar sobre una interacción directa y optamos por estudiar el efecto del silenciamiento de ambas proteínas por separado. Así, observamos que la depleción de BST-2 correlaciona con un descenso de los niveles de Ets1 de un 35 % a las 8 h de estimulación por TNF, tiempo de máxima inducción de Ets1 (Fig. 35A). Además, por otro lado, la depleción de Ets1 correlaciona con una notable subida de los niveles de BST-2, del orden de 12 veces a 24 h de estimulación con TNF, tiempo de máxima inducción de BST-2 (Fig. 35B). Estos datos indican que BST-2 podría inducir la síntesis de Ets1 por la vía de NF- κ B, sugiriendo la existencia de un mecanismo sensor de los niveles de Ets1. En efecto, si los niveles de Ets1 son bajos, se induciría la síntesis de BST-2 para a su vez favorecer la síntesis de Ets1. Esta regulación parece ser específica de Ets1 en la medida en que los niveles de ICAM-1, otra proteína paradigmática regulada por la vía NF- κ B no variaron significativamente.

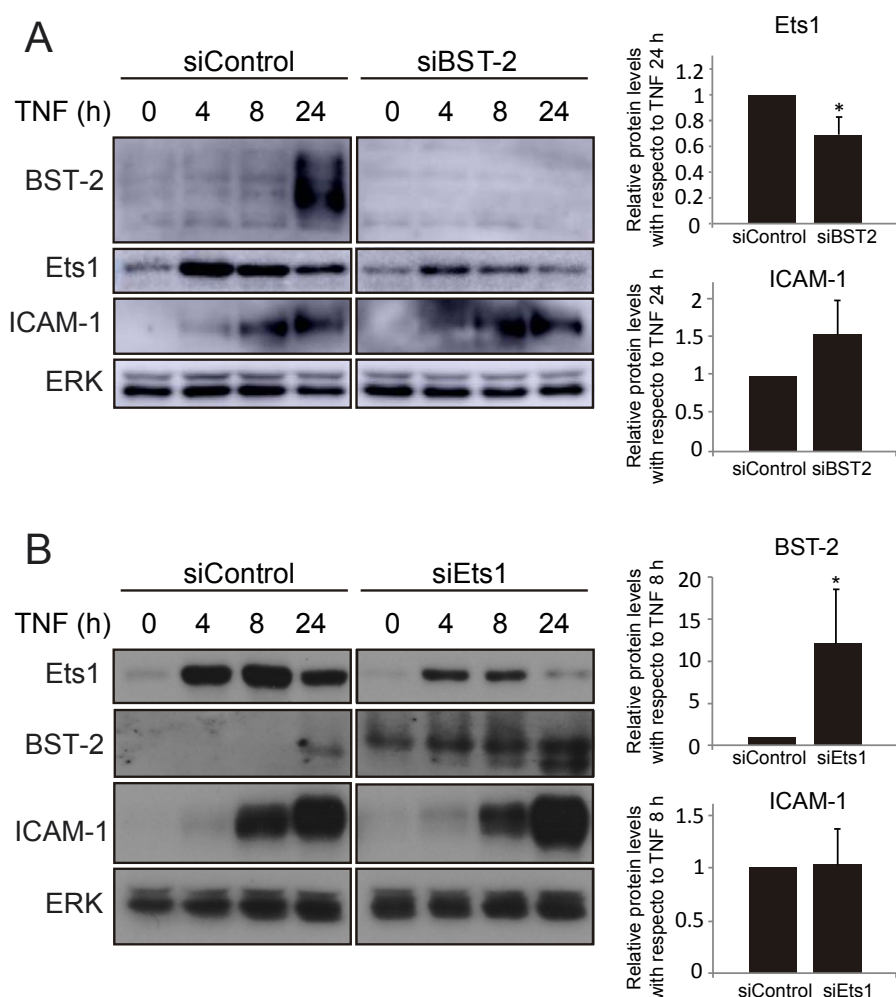


Figura 35. El silenciamiento de BST-2 reduce los niveles de Ets1 y el silenciamiento de Ets1 produce un fuerte incremento de los niveles de BST-2. (A) HUVEC fueron silenciadas con ARN de interferencia control o contra BST-2 (3'UTR), estimuladas con TNF durante 0, 4 8 y 24 h, lisadas y las proteínas indicadas monitorizadas por inmunoblot. Los gráficos de la derecha corresponden a la media \pm SEM de Ets1 e ICAM-1 correspondientes a 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05. (B) HUVEC fueron silenciadas con ARN de interferencia control o contra Ets1, estimuladas con TNF durante 0, 4, 8 y 24 h, lisadas y las proteínas indicadas monitorizadas por inmunoblot. Los gráficos de la derecha corresponden a la media \pm SEM de BST-2 e ICAM-1 correspondientes a 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05.

3.9. El silenciamiento de BST-2 retrasa la salida de VE-cadherina a la superficie celular tras un ensayo de depleción de calcio.

Habiendo observado en los experimentos anteriores que la ausencia de BST-2 reduce los niveles de VE-cadherina, así como los de su factor de transcripción Ets1, nos preguntamos si la reducción de la población intracelular de VE-cadherina, la cual es sintetizada *de novo*, conlleva un retraso en la salida de VE-cadherina a la superficie celular. Para ello, decidimos marcar la superficie de HUVEC silenciadas con un ARN de interferencia control o contra BST-2 (3'UTR) con Sulfo-NHS-Biotina después de someterlas a un ensayo de depleción de calcio a diferentes tiempos, lisarlas y purificar la fracción de proteínas de superficie por *pull-down* con neutravidina-agarosa (Fig. 36). De este modo, pudimos monitorizar por inmunoblot los niveles de la población de superficie de VE-cadherina a lo largo de una cinética de depleción y reposición de calcio. Así, observamos que en condiciones control, a

pesar de darse una bajada de los niveles de superficie a tiempos tempranos de reposición, los niveles totales tienden a recuperarse, obteniéndose un 75 % de la cantidad inicial de VE-cadherina de superficie tras 45 min de recuperación. Sin embargo, la depleción de BST-2 conlleva, en entrada, una disminución de los niveles de superficie de VE-cadherina y provoca una recuperación de sólo el 40 % de los niveles de VE-cadherina de superficie iniciales tras 45 min. Estos datos sugieren por tanto que la ausencia de BST-2 limita la salida de VE-cadherina hacia la superficie celular. Sorprendentemente, a pesar de no haber detectado ninguna asociación directa entre BST-2 y VE-cadherina, observamos que la proporción de BST-2 asociada a la fracción biotinilada aumenta ligeramente después de realizar la depleción de calcio, es decir, después de que la VE-cadherina salga desde el citoplasma hacia la superficie celular. Podríamos por tanto hipotetizar una función de BST-2 a modo de sensor de los niveles de VE-cadherina u otras proteínas de membrana.

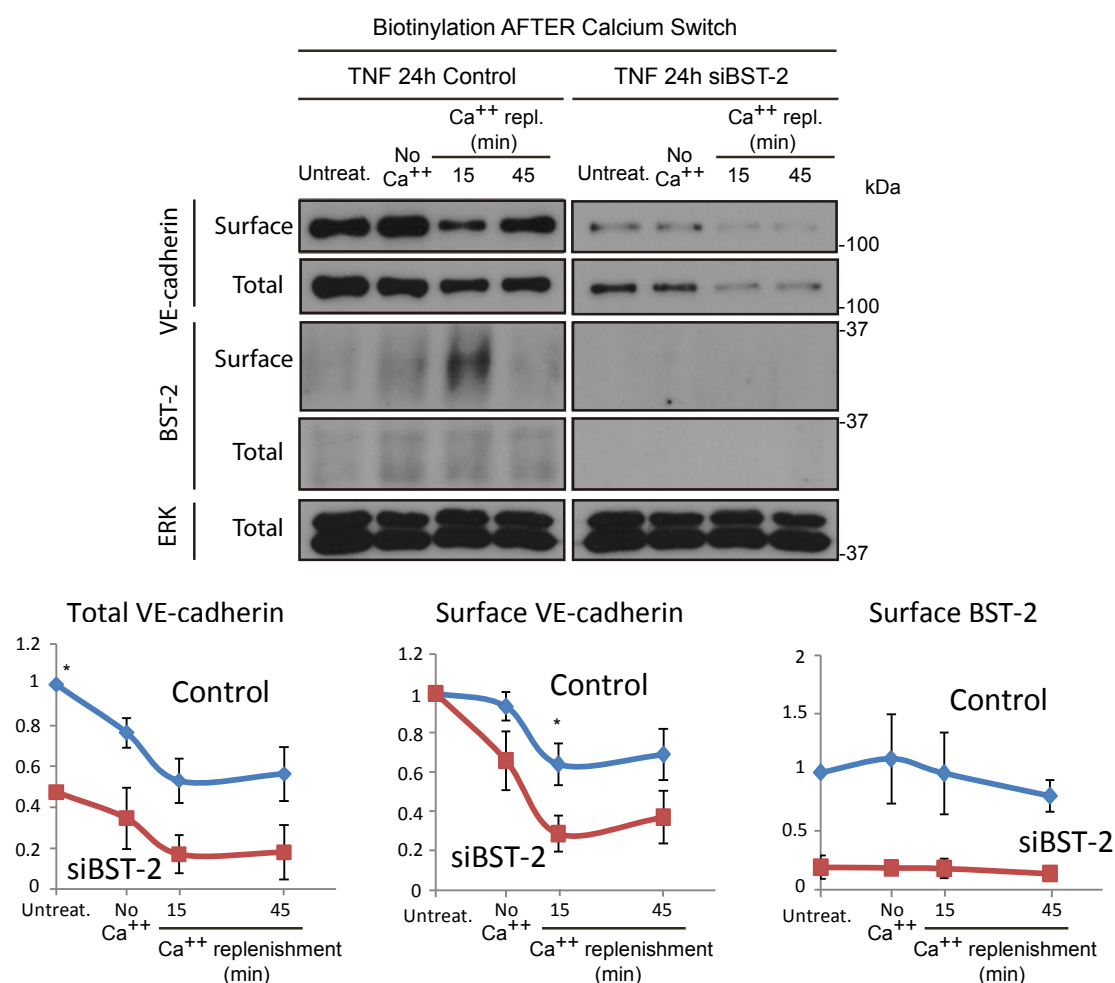


Figura 36. El silenciamiento de BST-2 reduce la salida de VE-cadherina a la superficie celular en HUVEC estimuladas con TNF sometidas a un ensayo de depleción de calcio. HUVEC fueron silenciadas con siARN de interferencia control o contra BST-2 (3'UTR), estimuladas con TNF durante 24 h, sometidas a un ensayo de depleción de calcio con tiempos de recuperación de 0, 15 y 45 min, marcadas en superficie con Sulfo-NHS-Biotina, lisadas y la fracción de proteínas de superficie purificada por *pull-down* con neutravidina agarosa. Los gráficos inferiores corresponden a la media \pm SEM de los niveles de las proteínas indicadas correspondientes a 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05.

3.10. La depleción de BST-2 reduce la vida media de la población de VE-cadherina de superficie.

En el contexto de un posible papel por parte de BST-2 en la preservación de la integridad de VE-cadherina, decidimos investigar el efecto del silenciamiento de BST-2 sobre la vida media de la VE-cadherina presente en superficie de HUVEC. Así, marcamos la superficie de HUVEC silenciadas con un ARN de interferencia control o contra BST-2 (3'UTR) y estimuladas con TNF durante 24 h con Sulfo-NHS-Biotina, esta vez antes de someterlas a un ensayo de depleción de calcio, lisarlas a diferentes tiempos y purificar la fracción de proteínas de superficie por *pull-down* con neutravidina-agarosa (Fig. 37). De este modo, pudimos monitorizar por inmunoblot el devenir de la VE-cadherina de superficie a lo largo de la cinética de depleción y reposición de calcio, observando que en condiciones control, en HUVEC estimuladas con TNF durante 24 h, se pierde una proporción de 30 % de VE-cadherina de superficie en 45 min, lo cual concuerda con los datos ya obtenidos (Fig. 11). Sin embargo, cuando deplecionamos BST-2, se pierde una proporción del 70 % en ese mismo tiempo. Además, observamos que después de provocar la depleción de calcio, BST-2 aparece asociado en mayor medida con la fracción biotinilada en las células control, como en el experimento en el que marcamos la superficie celular después del ensayo de depleción/reposición de calcio (Fig. 36). Estos datos sugieren que BST-2 podría estar favoreciendo de algún modo la estabilidad de los complejos de VE-cadherina presentes en la membrana celular o incluso, actuando como ya se ha dicho, como sensor de sus niveles.

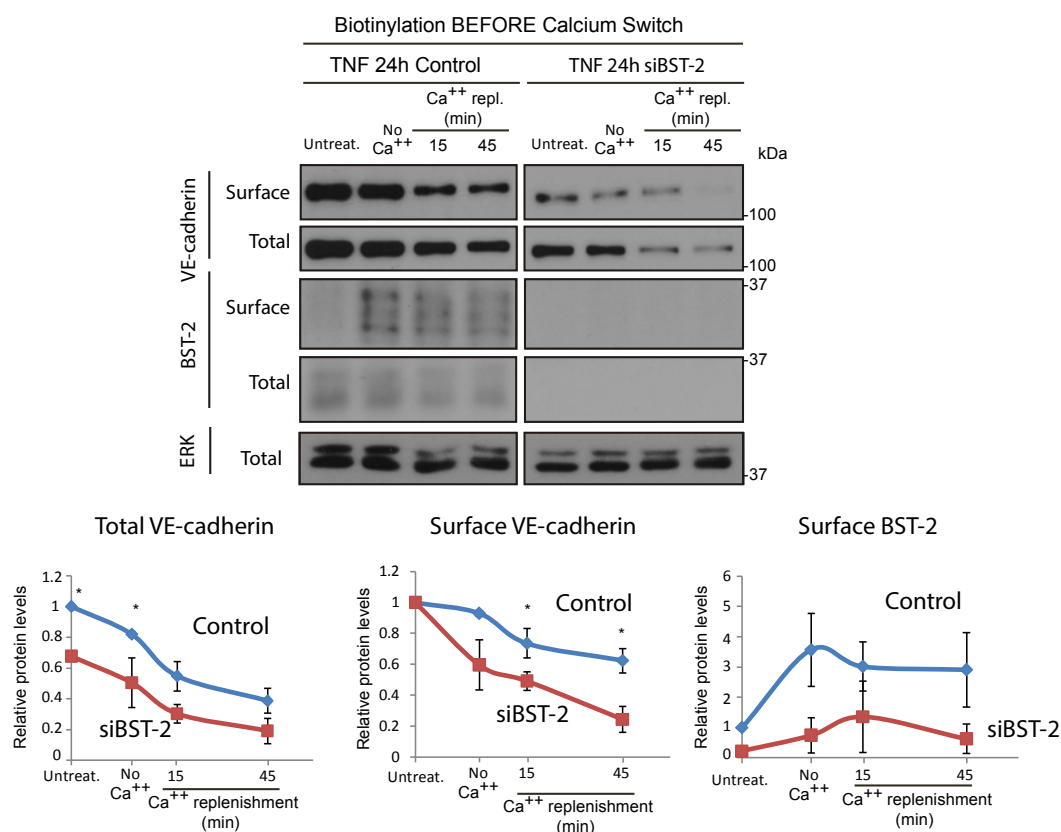


Figura 37. El silenciamiento de BST-2 reduce la vida media de VE-cadherina de superficie en HUVEC estimuladas con TNF sometidas a un ensayo de depleción de calcio. HUVEC fueron silenciadas con ARN de interferencia control o contra BST-2 (3'UTR), estimuladas con TNF durante 24 h, marcadas en superficie con Sulfo-NHS-Biotina, sometidas a un ensayo de depleción de calcio con tiempos de recuperación de 0, 15 y 45 min, lisadas y la fracción de proteínas de superficie purificada por *pull-down* con neutravidina agarosa. Los gráficos inferiores corresponden a la media \pm SEM de los niveles de las proteínas indicadas correspondientes a 3 experimentos independientes. *p-valor<0.05.

3.11. La depleción de BST-2 limita la recuperación de la función de barrera en HUVEC tras la supresión de la señalización por TNF.

Una vez caracterizado el efecto del silenciamiento de BST-2 sobre la salida de la VE-cadherina a la superficie celular, así como su vida media, quisimos investigar si este fenómeno tenía alguna implicación funcional en la recuperación de la función de barrera del endotelio vascular tras un estrés disruptivo.

Para ello, realizamos primero un seguimiento de la TEER de HUVEC silenciadas con un ARN control o contra BST-2 a las que sometimos a un ensayo de depleción/reposición de calcio. No observamos diferencias significativas en la recuperación de la función de barrera tras dicho estrés disruptivo (datos no mostrados), posiblemente debido a la existencia de mecanismos compensatorios en la reформación de uniones adherentes independientes de VE-cadherina que estriban en la función de Tie2 (Frye et al., 2015) o N-cadherina (Colás et al., datos no publicados).

En consecuencia, decidimos emplear una estrategia complementaria para observar el papel de BST-2 en algún proceso de recuperación de función de barrera que estribara también en la maduración de uniones intercelulares dependientes de VE-cadherina. Así, optamos por observar la recuperación de la función de barrera tras la terminación de un estímulo inflamatorio. Estimulamos por tanto HUVEC deplecionadas o no para BST-2 con TNF durante 20 h y después suprimimos dicho estímulo mediante el reemplazo del medio de cultivo por medio fresco sin TNF. Monitorizamos la TEER durante todo el proceso mediante el sistema ECIS y observamos que, a partir de la retirada del TNF, las células control vieron incrementada su resistencia durante 10 h, mientras que las células silenciadas para BST-2 apenas incrementaron su resistencia (Fig. 38B). En paralelo, observamos por inmunofluorescencia que las células silenciadas para BST-2 presentaron niveles menores de VE-cadherina total y en superficie a los diferentes tiempos de la cinética de estimulación por TNF (Fig. 38A)

Además, con el fin de comprobar que la ausencia de recuperación de la función de barrera en células silenciadas para BST-2 dependía efectivamente de VE-cadherina, decidimos realizar un ensayo similar de estimulación y retirada de TNF en células silenciadas para BST-2 en presencia y ausencia de un anticuerpo dirigido contra un dominio extracelular de VE-cadherina, capaz de bloquear su función adhesiva (Fig. 38C). Así, observamos por un lado que, en condiciones control, la adición del anticuerpo bloqueante de VE-cadherina inhibió la recuperación de la función de barrera. Por otro, en células silenciadas para BST-2, dicha recuperación no se dio ni en ausencia ni en presencia del anticuerpo bloqueante de VE-cadherina. Podemos concluir por tanto que la depleción de BST-2 remedia el bloqueo de la función de VE-cadherina en el contexto de la recuperación de función de barrera tras la terminación de un estímulo inflamatorio.

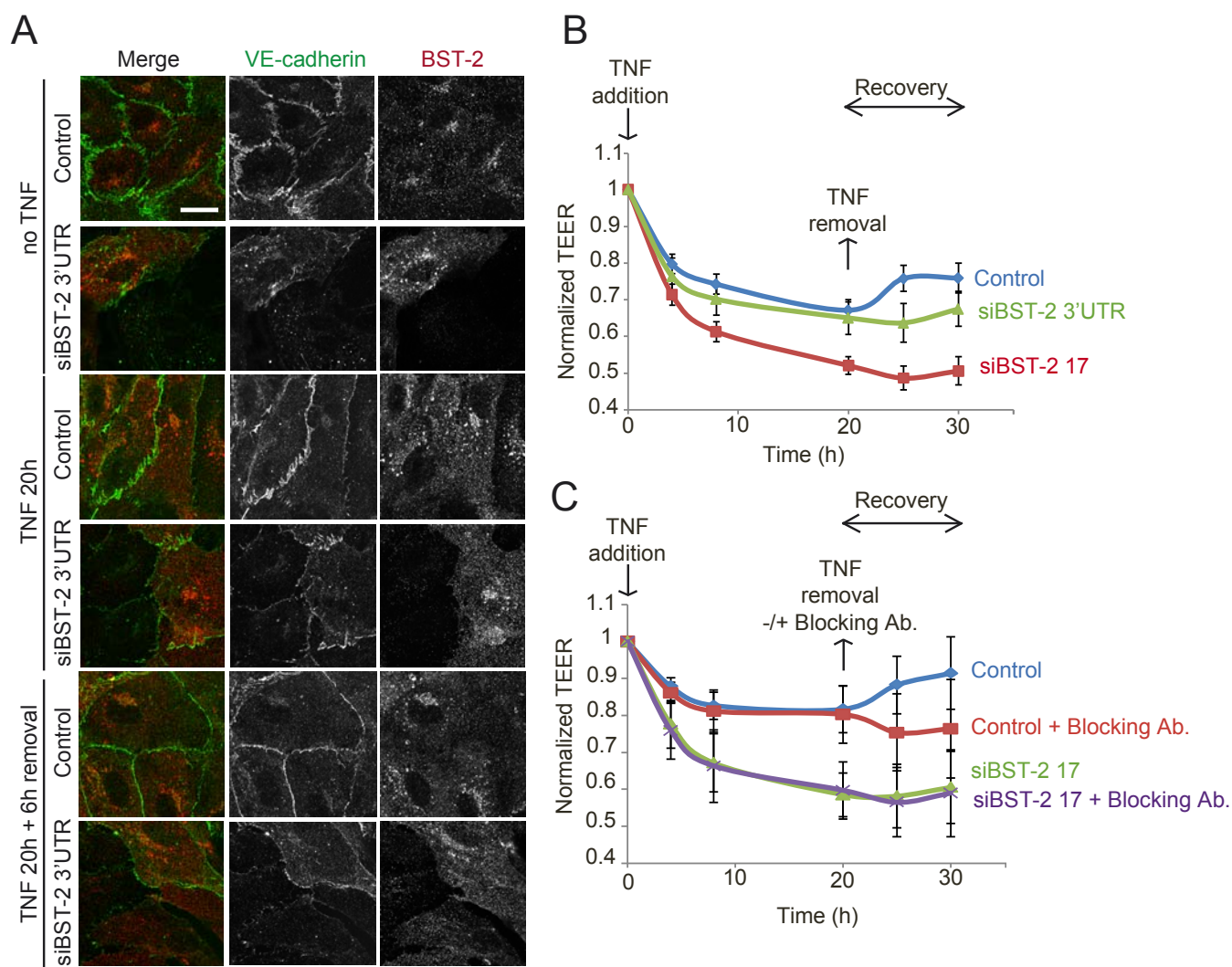


Figura 38. El silenciamiento de BST-2 limita la recuperación de la función de barrera tras la terminación de un estímulo inflamatorio. (A) HUVEC fueron silenciadas con un ARN de interferencia control o contra BST-2 (3'UTR), estimuladas o no con TNF durante 20 h, y estimuladas con TNF durante 20 h con un periodo de retirada de TNF de 6 h, fijadas y sometidas a inmunofluorescencia para observar las proteínas VE-cadherina y BST-2. Barra de escala, 20 μ m. (B) HUVEC fueron silenciadas con tres ARN de interferencia, uno control y dos diferentes contra BST-2 (17 y 3'UTR). Las células fueron sembradas en medio pobre en factores de crecimiento y estimuladas con TNF durante 20 h, siendo dicho medio retirado al cabo de las 20 h y reemplazado por medio pobre en factores de crecimiento sin TNF. La resistencia endotelial de dichas monocapas celulares fue monitorizada mediante el sistema ECIS. La cuantificación corresponde a la media \pm SEM de un mínimo de 3 experimentos independientes. (C) HUVEC fueron silenciadas con dos ARN de interferencia, uno control y otro contra BST-2 (17). Las células fueron sembradas en medio pobre en factores de crecimiento y estimuladas con TNF durante 20 h, siendo dicho medio retirado al cabo de las 20 h y reemplazado por medio pobre en factores de crecimiento sin TNF al que se le añadió un anticuerpo bloqueante de VE-cadherina o una inmunoglobulina control (0.5 μ g/ μ l). La resistencia endotelial de dichas monocapas celulares fue monitorizada mediante el sistema ECIS. La cuantificación corresponde a la media \pm SEM de 2 experimentos independientes.

4. BST-2 SE INDUCE EN RESPUESTA A LA INFECCIÓN POR *NEISSERIA MENINGITIDIS* EN DIFERENTES TIPOS CELULARES ENDOTELIALES Y CO-LOCALIZA CON LA POBLACIÓN DE VE-CADHERINA RELOCALIZADA BAJO LAS COLONIAS BACTERIANAS.

A lo largo de los experimentos anteriores, hemos observado que la proteína BST-2 es inducida en respuesta a TNF y requerida en un contexto inflamatorio para una correcta regulación de la función de barrera a través del mantenimiento de los niveles y la integridad de VE-cadherina. Llegados a este punto, nos preguntamos si BST-2 pudiera estar implicado en otros procesos patológicos de alteración de barrera endotelial en los que participa VE-cadherina. En este sentido, decidimos emplear el modelo de estrés endotelial producido por la infección con la bacteria *Neisseria meningitidis*, que produce meningitis tras atravesar la barrera endotelial, por cuanto se describió recientemente un proceso de relocalización de VE-cadherina desde las uniones intercelulares hasta las colonias de *Neisseria* en células endoteliales, quedando confinada en estructuras en forma de “panal de abeja” (Coureuil et al., 2009).

4.1. La infección de diferentes tipos celulares endoteliales con *Neisseria meningitidis* induce la expresión de BST-2.

Con el fin de estudiar si la infección de distintos tipos de células endoteliales con *Neisseria meningitidis* induce la expresión de BST-2, realizamos cinéticas de infección de 0, 1 y 4 h en células microvasculares HDMVEC, HCMEC/D3 y HBMEC previamente estimuladas o no con TNF durante 24 h (Fig. 39). Observamos que en dos de los tres tipos celulares, ICAM-1 se induce en respuesta a la infección y a TNF, lo cual indica que la infección se realizó correctamente (Dixon et al., 1999). En cuanto a la proteína BST-2, sus niveles permanecieron bajos a lo largo de todas las cinéticas realizadas en HDMVEC, de forma parecida a los detectados para ICAM-1. Sin embargo, BST-2 se indujo dos veces en respuesta a la infección en las células endoteliales de medula ósea, HBMEC, y tres veces, HCMEC/D3, en el modelo endotelial de barrera hematoencefálica, así como también en respuesta a TNF en ambos tipos celulares. Los niveles de la proteína VE-cadherina no variaron significativamente en respuesta a la infección.

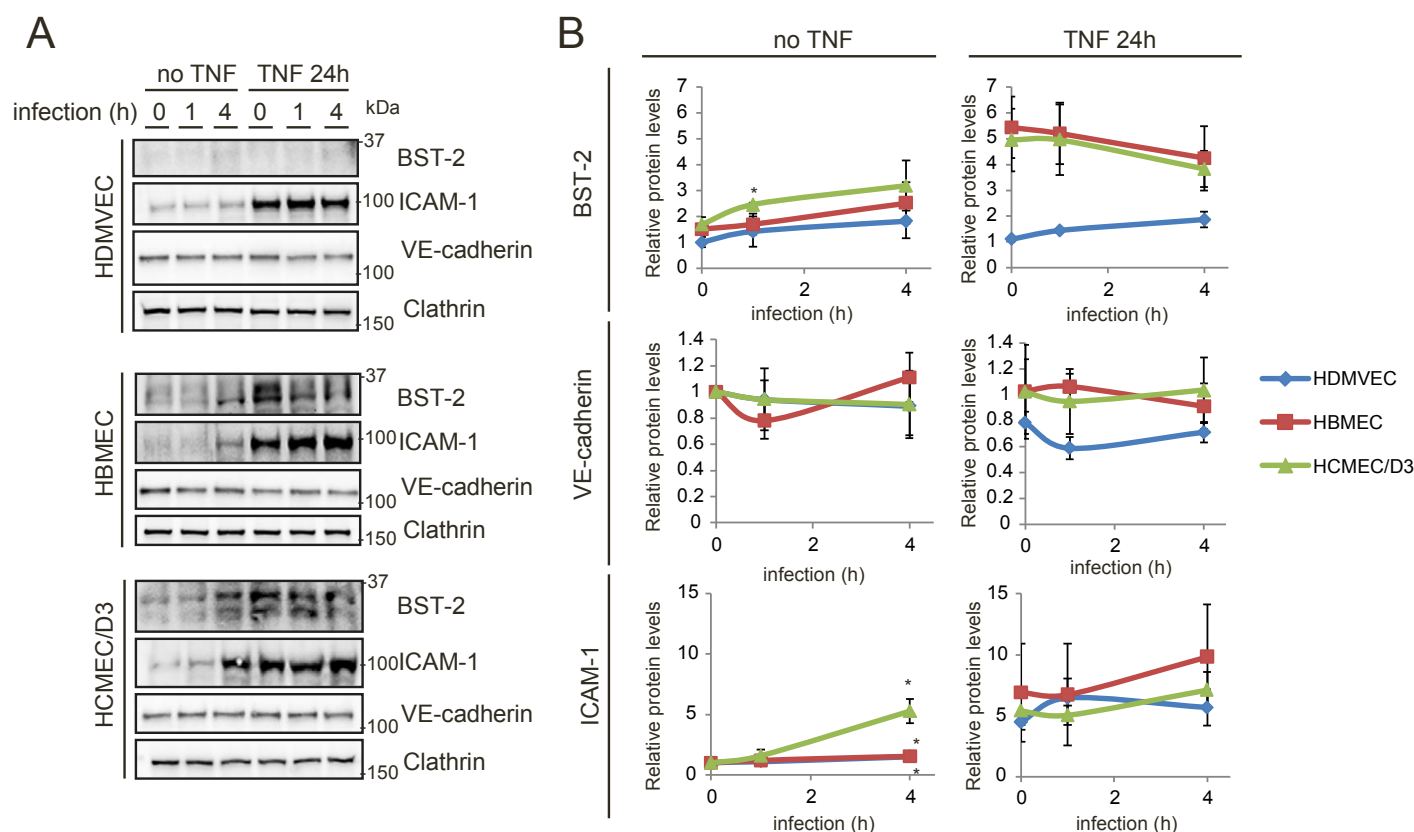


Fig. 39. La infección de diferentes tipos celulares endoteliales con *Neisseria meningitidis* induce la expresión de BST-2. HDMVEC, HBMEC y HCMEC/D3 fueron estimuladas o no con TNF durante 24h e infectadas con *Neisseria meningitidis* durante 0, 1, y 4 h. Las células infectadas o no fueron lisadas y las proteínas indicadas monitorizadas por inmunoblot. Los gráficos de la derecha corresponden a la media \pm SEM de los niveles de BST-2, VE-cadherina e ICAM-1 en 3 experimentos independientes. *p-valor < 0.05.

4.2. BST-2 se relocaliza bajo las colonias de *Neisseria meningitidis*.

Posteriormente, quisimos estudiar el posible papel desempeñado por BST-2 en el proceso de relocalización de VE-cadherina desde las uniones intercelulares hacia las uniones ectópicas que se generan con una estructura en forma de “panal de abeja” bajo las colonias de *Neisseria meningitidis* (Coureuil et al., 2009). Para ello, realizamos infecciones a 4 h con *Neisseria meningitidis* en HDMVEC, HBMEC y HCMEC/D3. Por un lado, observamos que la falta de inducción de BST-2 en HDMVEC, correlaciona con la ausencia de redistribución de VE-cadherina en estructuras de panal de abeja alrededor de las bacterias en respuesta a la infección. Por otro, observamos que BST-2 se induce y se relocaliza en estructuras en forma de “panal de abeja” en HBMEC y HCMEC/D3 (Fig. 40). En las células no infectadas, BST-2 presenta en estos tipos endoteliales una distribución clásica perinuclear similar a la ya descrita en HUVEC, a nivel de la red trans-Golgi (TGN) (datos no mostrados).

Estos datos sugieren que BST-2 puede ser requerida para mantener la estabilidad de VE-cadherina en su reciclaje desde las uniones adherentes hacia las uniones ectópicas. En efecto, en consonancia con estos datos, ya se mostró mediante marcaje con el anticuerpo contra VE-cadherina de superficie que las moléculas de VE-cadherina que se relocalizan proceden de las uniones intercelulares y no de la población de nueva síntesis. Además, la internalización de la misma era necesaria para su relocalización (Coureuil et al. 2009).

Con el fin de completar este trabajo, sería necesaria la transfección de BST-2 en células en las que no se forman uniones ectópicas en forma de panal de abeja en respuesta a la infección, como las HDMVEC y estudiar el mantenimiento de la integridad de VE-cadherina durante el eventual reciclaje de ésta bajo las colonias bacterianas. También se podría silenciar BST-2 y estudiar si se abroga dicho proceso de reciclaje. Además, se podría estudiar este fenómeno en células primarias de barrera hematoencefálica, en las cuales se ha detectado una inducción de BST-2 de entre 2 y 3 veces (Dra. Bourdoulous, comunicación personal).

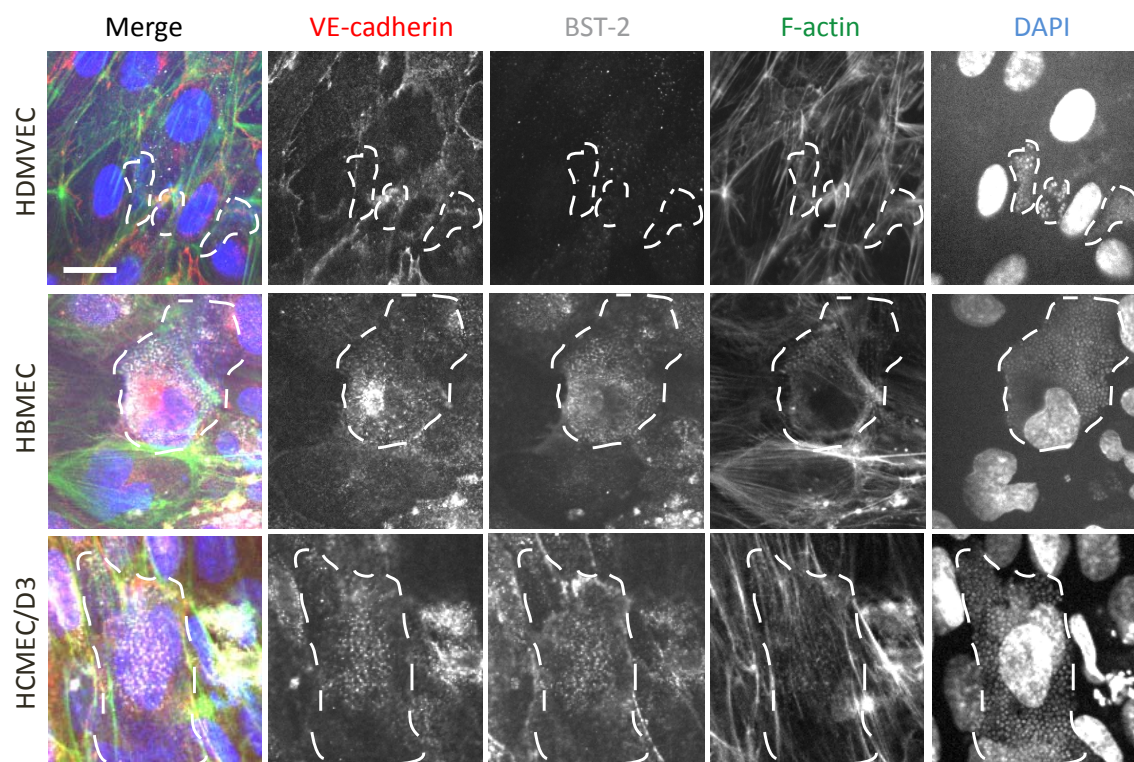


Fig. 40. BST-2 se relocaliza junto con VE-cadherina bajo las colonias bacterianas en células HBMEC y HCMEC/D3 infectadas por *Neisseria meningitidis*. HDMVEC, HBMEC y HCMEC/D3 fueron infectadas con *Neisseria meningitidis* durante 4 h, fijadas y sometidas a inmunofluorescencia. Las proteínas VE-cadherina y BST-2 fueron marcadas mediante anticuerpos específicos. La actina filamentosa fue marcada con faloidina. Los núcleos celulares y las bacterias fueron marcados con DAPI. Las colonias bacterianas se señalan con un patrón de líneas discontinuas. Barra de escala 10 μ m.

DISCUSIÓN

El TNF es un actor clave del fenómeno inflamatorio. En efecto, estudios publicados durante las últimas décadas demuestran que dicha citoquina modula la fisiología de varios tipos celulares, orquestando así finamente el proceso inflamatorio desde su inicio hasta su terminación (Bradley, 2008). El efecto de TNF sobre la función de barrera es progresivo y a largo plazo, ya que se fundamenta principalmente en la puesta en marcha un programa transcripcional específico no del todo caracterizado (Collins et al., 1995; Pober et al., 1987; Wójciak-Stothard et al., 1998, Wójciak-Stothard et al., 2001; Wojciak-Stothard y Ridley, 2002; McKenzie y Ridley, 2007; Fernández-Martín et al., 2012; Marcos-Ramiro et al., 2014).

En esta tesis, hemos investigado la función de proteínas endoteliales, cuya expresión es incrementada por TNF, que juegan un papel en la alteración transitoria de la barrera endotelial vascular. Una de ellas, la GTPasa RhoB, regula negativamente la extensión de membrana necesaria para que se establezcan los contactos entre células y forma parte, por tanto, del conjunto de proteínas que TNF controla para debilitar la función de barrera, lo que tiene consecuencias no sólo fisiológicas, sino probablemente patológicas, como veremos a continuación. Las otras proteínas analizadas podrían constituir una ruta de señalización para compensar este efecto desestabilizador de la barrera endotelial. Nuestros datos apuntan a que la activación de la expresión de BST-2/Ets1/VE-cadherina es requerida para mantener los niveles de VE-cadherina en la superficie endotelial, esenciales no sólo para la permeabilidad sino también para la supervivencia celular, a pesar de que TNF divierte el tráfico de esta cadherina a una ruta degradativa. Hemos observado estos cambios de naturaleza homeostática en endotelios relativamente impermeables, como los constituidos por HUVECs, provenientes de vasos grandes, o HDMEC/D3, provenientes de la barrera hematoencefálica, pero no en células microvasculares dermales, cuyo colapso, presumiblemente sólo tiene un efecto local y no tiene consecuencias sistémicas.

Las dos partes del estudio muestran que en la formación de una barrera celular es importante tanto la activación de mecanismos moleculares ancestrales que permiten la extensión de membranas plasmática -a modo de lamelipodios, los cuales permiten establecer contactos intercelulares- así como el establecimiento de los mismos contactos a través de complejos multiproteicos como las uniones adherentes. TNF, como hemos visto, modula ambos procesos.

1. RHOB REGULA NEGATIVAMENTE LA RECUPERACIÓN DE LA FUNCIÓN DE BARRERA ENDOTELIAL TRAS LA CONTRACCIÓN AGUDA MEDIANTE LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE RAC1 EN CÉLULAS MICROVASCULARES.

En la literatura encontramos trabajos que describen el aumento de los niveles de la GTPasa RhoB en respuesta a estímulos como la IL-1 y otras citoquinas inflamatorias (Kroon et al.,

2013), la luz ultravioleta o incluso factores de crecimiento (Croft y Olson, 2011). Este fenómeno se produce en el mismo sentido que lo ya observado en HUVEC en respuesta a TNF por Marcos-Ramiro (Marcos-Ramiro, 2015, Tesis Doctoral). Sin embargo, una pregunta que quedaba sin resolver concernía el tipo de vaso sanguíneo en el que se expresa RhoB durante la enfermedad inflamatoria, y si estos cambios de expresión en respuesta a la estimulación inflamatoria son específicos o selectivos de esta GTPasa o si por el contrario, se trata de un fenómeno extendido a toda la familia, puesto que sus miembros son reguladores maestros de muchos procesos relacionados con la inflamación. En el caso que nos ocupa, nuestros datos sugieren que RhoB se induce en vasos pequeños, y al menos en pacientes con enfermedad de Crohn, en vénulas postcapilares, es decir, aquellos vasos donde la función de barrera está más comprometida y donde se da un mayor flujo de células del sistema inmune y otras moléculas desde el plasma hacia el tejido subyacente. También hemos podido observar que TNF induce un aumento de los niveles de RhoB del orden de 3 veces por un mecanismo de regulación transcripcional en células microvasculares humanas *in vitro*, manteniéndose constantes los niveles de RhoA y RhoC. Aunque los datos acerca del resto de la subfamilia se obtuvieron con HUVECs, sólo Rnd1 y RhoB incrementan su expresión en respuesta a TNF, sugiriendo un papel específico para estas dos proteínas dentro de la familia de las Rho GTPasas.

Para poder estudiar el papel desempeñado por las Rho GTPasas en la célula, se pueden emplear diferentes aproximaciones orientadas a la pérdida de función de dichas proteínas. Por un lado, numerosos estudios se han basado en la utilización de inhibidores de la subfamilia RhoA como la toxina C3 transferasa (Aktories y Hall, 1989). Esta técnica es sencilla por cuanto estriba en la adición de la toxina en los cultivos celulares, pero presenta la desventaja de inhibir todas las proteínas de la subfamilia RhoA a la vez, lo que no nos permite discriminar entre RhoA, RhoB y RhoC. Por otro, estudios más recientes se basan en el silenciamiento con ARN de interferencia de las proteínas Rho individuales (Endo et al., 2006), lo que permite discernir entre las funciones especializadas de los miembros de cada subfamilia. Así, se ha podido observar que la depleción de RhoB reduce específicamente la adhesión de macrófagos, células epiteliales de pulmón y células de cáncer de próstata (Bousquet et al., 2009; Vega et al., 2015; Wheeler y Ridley, 2007) y aumenta la capacidad migratoria de macrófagos y células epiteliales de pulmón (Bousquet et al., 2009; Wheeler y Ridley 2007; Bousquet et al., 2016).

En línea con lo descrito en estos trabajos, nuestros experimentos muestran que, en un contexto inflamatorio, el silenciamiento de RhoB con ARN de interferencia en células microvasculares humanas subconfluentes –en ausencia de uniones intercelulares– provoca una aceleración de la re-expansión celular en el período de recuperación tras una estimulación con trombina. Además, dicha re-expansión correlaciona con un aumento de la actividad de Rac1 y una aceleración de la recuperación de la función de barrera en ensayos de medición de resistencia transendotelial con células microvasculares confluentes. En este sentido, estos datos, junto con los obtenidos previamente, indican que RhoB puede estar regulando negativamente la recuperación de la función de barrera por un mecanismo independiente de la formación de uniones intercelulares, que implica la extensión de membrana a través de mecanismos parecidos a los que la célula implementa durante los

procesos de *spreading* durante la migración celular. Aunque no hemos observado un efecto de RhoB sobre los niveles de VE-cadherina, se ha demostrado en células epiteliales que RhoB es capaz de regular los niveles de proteínas implicadas en el establecimiento de uniones intercelulares como E-Cadherina, (Vega et al., 2015), lo cual indica que el papel de RhoB puede variar en función del tipo celular que se considere.

Nuestros resultados en células microvasculares y los resultados previos con HUVECs muestran claramente que RhoB y Rac1 colocalizan en un compartimento intracelular, en el cual Rac1 es retenido en respuesta a la activación de RhoB (Marcos-Ramiro, JCB, 2016). Sin embargo la caracterización de este compartimento no había sido determinada en detalle, por lo que se llevó a cabo un análisis de la distribución de RhoB con diferentes marcadores del compartimento endosomal. Observamos que existía una colocalización parcial entre ambas GTPasas en un compartimento endosomal mayoritariamente tardío, positivo para Rab7, y no en un compartimento de reciclaje. Puesto que el modelo actual postula que Rac1 debe reciclar para encontrarse con sus GEFs y activarse en el borde celular, nuestros resultados sugieren que RhoB acumula Rac1 en este compartimento endosomal tardío, impidiendo su reciclaje y subsecuente activación. Además, gracias a la realización de ensayos de biotinylación dependiente de proximidad, pudimos confirmar que RhoB y Rac1 se encuentran en proximidad y por tanto que podrían interactuar transitoriamente en este compartimento endosomal tardío.

En efecto, ya se ha demostrado que RhoB, a diferencia de RhoA y RhoC, se encuentra en endosomas (Adamson et al., 1992) y que regula el tráfico de algunas proteínas transmembrana como EGF (Gampel et al., 1999), TNFR (Kroon et al., 2013) y de quinasas de la familia Src (Sandilands et al., 2004). RhoB regula la retención de estas proteínas y de Rac1 en un compartimento endosomal tardío, probablemente a través de sus efectores, las forminas mDia1 (Watanabe et al., 1999; Fernandez-Borja et al., 2005) y mDia2 (Waller et al., 2007). En efecto, dichas forminas son capaces de polimerizar actina alrededor de los endosomas, generándose filamentos de actina a los que los endosomas podrán anclarse, frenándose así el tráfico vesicular. Por lo tanto, la redirección de Rac1 hacia la periferia celular se vería impedida, lo que limitaría su activación por la GEF Tiam1 (Schlegel y Waschke, 2014). En consecuencia, Rac1 no podría activar sus efectores, los cuales están presentes en la periferia celular, limitándose así la polimerización de actina cortical y la formación de protrusiones de membrana.

La regulación de este mecanismo de re-extensión celular, aunque no radique *per se* en la formación de uniones intercelulares, sí que es un pre-requisito para que éstas se formen. En efecto, Abu Taha y colaboradores demostraron en 2014 que la extensión de lamelipodios circulares en células endoteliales favorece la formación y maduración de uniones adherentes. Así, se concentraría en el borde de la célula la maquinaria molecular necesaria para el establecimiento de dichas uniones (Abu Taha et al., 2014).

Por lo tanto, podríamos afirmar que las células endoteliales habrían aprovechado un mecanismo de expansión celular primitivo, típico de la vida migratoria unicelular como es la generación de protrusiones de membrana y lo habrían adaptado a una función inherente

a la vida multicelular, como es el mantenimiento de las uniones intercelulares y la función de barrera (García-Weber y Millán, 2016). RhoB podría por tanto regular negativamente este fenómeno, comprometiéndose así la integridad del endotelio vascular. Éste se volvería más sensible a estímulos disruptivos y se favorecería el desarrollo del proceso inflamatorio.

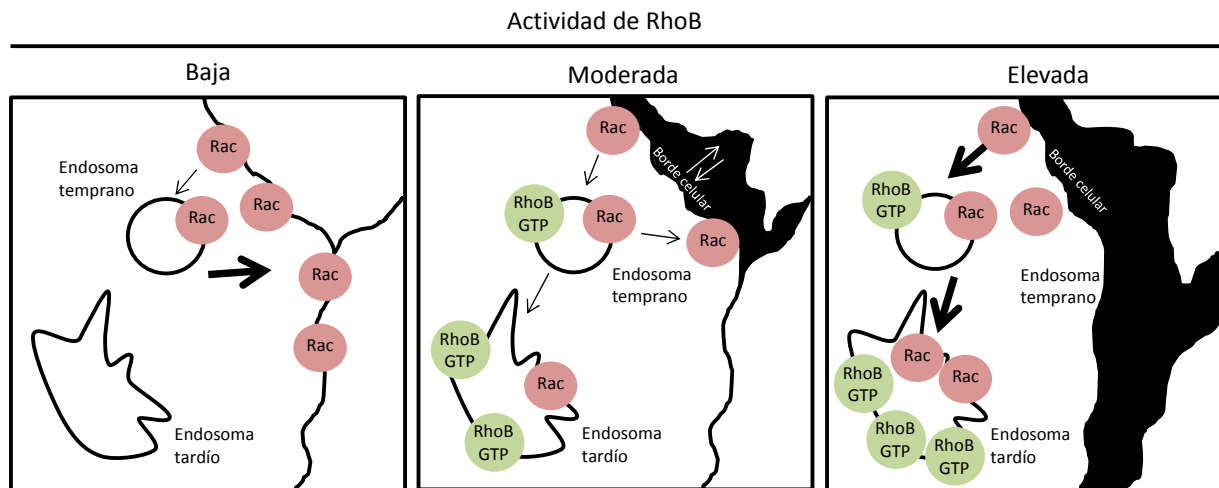


Ilustración 12: Modelo del tráfico intracelular de Rac1 regulado por RhoB. En células endoteliales, Rac1 trafica entre vesículas positivas para RhoB y la membrana plasmática, donde media la formación de protrusiones celulares. Cuando la actividad de RhoB es baja –ausencia de RhoB–, Rac1 puede activarse y localizarse preferentemente a nivel de la membrana plasmática, favoreciendo la extensión celular y la formación de uniones adherentes. Cuando la actividad de RhoB es moderada –ausencia de inflamación–, Rac1 es moderadamente retenida en endosomas tardíos positivos para RhoB y por lo tanto su presencia en membrana se reduce, formándose menos protrusiones de membrana y retrasando así moderadamente la formación de uniones intercelulares. Cuando la actividad de RhoB es elevada –inflamación–, Rac1 es principalmente retenida en compartimentos endosomales tardíos, por lo que su presencia en membrana desaparece, limitando en gran medida la formación de protrusiones de membrana y, por ende, la formación de las uniones intercelulares (Modificado de García-Weber et al., 2016).

2. DINÁMICA DE VE-CADHERINA

2.1. Disminución de la vida media de VE-cadherina en respuesta a TNF

Como hemos visto, la extensión de membranas celulares permite el establecimiento de uniones intercelulares que sellan la barrera endotelial. La VE-cadherina es una proteína esencial para la formación y el mantenimiento de las uniones intercelulares en el endotelio vascular (Dejana y Vestweber, 2013). Nuestros experimentos han puesto de manifiesto que la estimulación de células endoteliales con TNF a diferentes tiempos reduce la vida media de la VE-cadherina presente en las uniones adherentes. Esta pérdida acelerada de VE-cadherina parece darse principalmente por la vía de degradación del proteasoma.

Estos datos concuerdan con el aumento de la permeabilidad endotelial en respuesta a TNF ya descrito por otros autores (Vandenbroucke et al., 2008). En este sentido, Sawant y

colaboradores demostraron que la inhibición de la degradación de VE-cadherina por la vía del proteasoma atenuaba la permeabilidad microvascular (Sawant et al., 2011).

Sin embargo, no podemos excluir que la degradación acelerada de VE-cadherina en respuesta a TNF pueda operarse también por una vía lisosomal. En efecto, nuestros datos muestran una moderada limitación de la degradación de VE-cadherina empleando inhibidores de dicha vía. Además, otros autores también han detectado acumulaciones intracelulares de VE-cadherina en células endoteliales mediante el empleo de Cloroquina, un potente inhibidor de la degradación lisosomal (Xiao, et al., 2003).

La aceleración de la degradación de VE-cadherina podría radicar en un aumento de la actividad de la maquinaria degradativa o en un aumento de la tasa de internalización de dicha proteína. En efecto, considerando este último caso, VE-cadherina es más proclive a ser internalizada cuando es fosforilada (Angelini et al., 2006; Nwariaku et al., 2002), fenómeno que se incrementa en respuesta a TNF. No podemos excluir tampoco la activación de un posible mecanismo de marcaje por ubiquitinación (Xiao et al., 2003) o un aumento de la actividad de la GTPasa Rab5, como ya se demostró en el contexto de la estimulación con LPS (Yang et al., 2015).

Otro fenómeno que podría inducir una mayor degradación de VE-cadherina es su corte proteolítico o “*shedding*”. En efecto, se ha demostrado que el corte de VE-cadherina por la metaloproteinasa ADAM10 se incrementa en respuesta a TNF (Schulz et al., 2008; Flemming et al., 2015). El trabajo de Flemming, por ejemplo, constituye un ejemplo de que este aumento del *shedding* de alguna manera es compensado por la célula, puesto que los niveles totales de VE-cadherina permanecen casi inalterados durante la exposición del endotelio a estímulos inflamatorios e incremento del procesamiento proteolítico. Calpaína también puede procesar esta cadherina (Su y Kowalczyk, 2017) e incrementar su tasa de degradación. Sería interesante estudiar si TNF regula de algún modo la síntesis o la actividad de esta maquinaria de procesamiento proteolítico.

En conjunto, la acción de todos estos mecanismos confluiría hacia la reducción de la vida media de VE-cadherina en células inflamadas. La cuestión por resolver quedaba entonces en por qué los niveles totales de VE-cadherina no disminuyen en nuestros estudios y muchos otros donde observan un aumento de la degradación de esta cadherina.

2.2. Aumento de la síntesis de VE-cadherina en respuesta a TNF

Nuestros experimentos muestran que los niveles de la proteína VE-cadherina aumentan en diferentes tipos celulares endoteliales en respuesta a la estimulación por TNF. Más concretamente, la población de VE-cadherina intracelular se incrementa, mientras que la población de superficie permanece constante. Hemos comprobado que este incremento es específico -los niveles de otras proteínas de intercelulares no varían- y que se opera a nivel transcripcional a través de la vía NF- κ B y el factor de transcripción Ets1.

En efecto, ya se demostró que otros factores de la familia ETS se regulan por la vía de NF- κ B, como en el caso de ESE-1 (Rudders et al., 2001), razón por la cual centramos nuestra atención en Ets1. Por otro lado, también se publicó que la sobreexpresión de Ets1 induce

la síntesis de VE-cadherina en células endoteliales (Lelièvre et al., 2000). Además, el promotor del gen de VE-cadherina, *Cdh5*, posee sitios de unión a Ets. (Gory et al., 1998). Sin embargo, no podemos excluir la participación de otros factores de transcripción en la inducción de VE-cadherina en respuesta a TNF como son HIF2 α (Le Bras et al., 2007) o SP1 (Gory et al., 1998).

2.3. Efecto de la aceleración de la tasa de reposición de VE-cadherina a nivel de las uniones intercelulares

Como se ha comentado, TNF induce un aumento de las tasas de degradación y síntesis de VE-cadherina en células endoteliales, lo que provoca que la tasa de reposición de dicha proteína aumente. Ya se demostró que TNF es capaz de alterar la dinámica de algunas proteínas de membrana. En efecto, aunque en un contexto diferente al que nos ocupa, Gao y colaboradores, describieron en 2000 que TNF acelera el reciclaje de las integrinas de tipo $\alpha 5 \beta 1$ en células endoteliales de pulmón, lo cual fomenta la redistribución de dichas proteínas y provoca un aumento de permeabilidad (Gao et al., 2000).

En este contexto, quisimos estudiar la dinámica de VE-cadherina en respuesta a un potente estímulo disruptivo como es la depleción de calcio (Yan et al., 2016). Así, observamos que en células previamente estimuladas con TNF, la internalización masiva de VE-cadherina inducida por la depleción de calcio resulta en un brusco descenso de los niveles totales de dicha proteína. Estos datos indican que la aceleración de la tasa de reposición de VE-cadherina dota al endotelio de menor resiliencia frente a futuros estímulos disruptivos por cuanto reduce drásticamente su “reserva” de VE-cadherina.

Sin embargo, a lo largo de todo este proceso, la población de superficie de VE-cadherina, es decir, aquella que se encuentra formando uniones intercelulares, tiende a permanecer constante y la recuperación de función de barrera se opera correctamente. Así, estos datos sugieren la existencia de un mecanismo celular que, incluso en un contexto en el que los niveles totales de VE-cadherina se reducen, permite mantener suficiente cantidad de esta proteína formando uniones intercelulares funcionales, preservándose así la integridad del endotelio. Esta reserva de VE-cadherina no parece estar sujeta a los procesos degradativos que se inducen en respuesta a la rotura de la barrera.

En efecto, algunos autores han descrito mecanismos que median el reciclaje y la redirección de VE-cadherina a la membrana celular. Por ejemplo, en el contexto de la estimulación de células endoteliales de pulmón con trombina, se ha demostrado que Rab11 y su interactor Rab11FIP2 son esenciales para que el proceso de reciclaje (Yan et al., 2016). Por otro, en estudios realizados sobre el síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, se ha visto que la fosforilación de LAMTOR/p18 (Chichger, et al., 2015) y la activación de Rab4 (Chichger et al., 2016) son necesarias para que VE-cadherina se redirija correctamente hacia la membrana.

Sin embargo, hasta donde llega nuestro conocimiento, la dinámica de VE-cadherina en el contexto de la estimulación por TNF no ha sido estudiada. Nuestros datos muestran claramente que TNF divierte VE-cadherina desde el reciclaje a una ruta degradativa que desemboca en un aumento de la tasa de reemplazamiento de VE-cadherina. En este

sentido, decidimos investigar si alguna proteína regulada por TNF pudiera actuar como sensor para regular el mantenimiento de niveles adecuados de VE-cadherina en la superficie celular.

3. BST-2 SE INDUCE EN RESPUESTA A TNF Y REGULA LOS NIVELES DE VE-CADHERINA EN CÉLULAS ENDOTELIALES HUMANAS.

Hipotetizamos que una proteína capaz de regular los niveles de VE-cadherina en superficie debe, al menos de forma temporal, residir en la membrana plasmática, sino en las uniones intercelulares. Como ya describimos anteriormente, llevamos a cabo un experimento de marcaje de superficie celular en HUVEC con Sulfo-NHS-Biotina y detectamos una serie de proteínas cuya expresión aumentaba en respuesta a TNF. En efecto, la mitad de las proteínas que se identificaron correspondían a marcadores de superficie celular, en parte por la naturaleza del ensayo y en parte porque en células endoteliales expresan una plétora de receptores de superficie y moléculas de adhesión en respuesta a TNF (Murakami et al., 2000; Franzén et al., 2003; Viemann et al., 2004; Viemann et al., 2006). Cabe señalar que existen grandes diferencias en cuanto a las proteínas reguladas por citoquinas proinflamatorias según el tipo celular endotelial que se estudie (Franzén et al., 2003). En el caso que nos ocupa, nos centramos en células de vasos grandes (HUVEC), a diferencia de células de vasos más pequeños (HDMVEC).

De entre las proteínas que se identificaron, algunas de ellas aumentaban sus niveles transcripcionalmente, como se observó por ensayos de PCR cuantitativa. Más concretamente, detectamos la inducción de Jagged1, el ligando de Notch1, lo cual ya fue observado en otros ensayos de modulación de proteínas por TNF (Viemann et al., 2004; Viemann et al., 2006). También observamos la inducción de Robo1, proteína no tan estudiada como Robo4 en un contexto inflamatorio, la cual se ha descrito que estabiliza la vasculatura (London y Li, 2011; Zhao et al., 2014). Además, observamos la inducción de proteínas tirosina fosfatasa de tipo receptor como RPTP κ . En efecto, este tipo de proteínas transmembrana pueden estar implicadas en el mantenimiento de la integridad vascular mediante la defosforilación de proteínas de uniones intercelulares, como en el caso de VE-PTP, DEP-1 o PTPB (Fournier et al., 2016). Otra proteína cuya expresión aumenta en respuesta a TNF es EHD1, uno de los reguladores maestros del reciclaje endosomal (Cai et al., 2013). Finalmente, también observamos la inducción de BST-2 tanto a nivel de ARN mensajero como de proteína. En efecto, BST-2, también conocida como tetherina, es una proteína que ha sido ampliamente estudiada por ser un factor de restricción de virus envueltos como el VIH (Mahauad-Fernandez y Okeoma, 2016). Sin embargo, en el caso que nos ocupa, hemos caracterizado una función para esta proteína en el mantenimiento de la integridad de las uniones intercelulares del endotelio vascular.

3.1. Efecto de BST-2 sobre la síntesis de VE-cadherina

Nuestros experimentos muestran que la depleción de BST-2 conlleva una reducción de los niveles de Ets1 y VE-cadherina y además sugieren que el dominio YxY de BST-2 es necesario para el mantenimiento de los niveles de VE-cadherina. En efecto, ya se demostró

que el dominio YxY está implicado en la inducción de la señalización por NF- κ B (Tokarev et al., 2013). Además, BST-2 interacciona con TAK1, TAB1 y TAB2 y potencialmente con TRAF2 y Myd88, activando la vía canónica de NF- κ B (Tokarev et al., 2013). Así, estos datos sugieren que BST-2 podría participar en la inducción de Ets1 y, por ende, la de VE-cadherina, a través de la vía de NF- κ B.

Esta hipótesis concuerda con la correlación observada en la inducción de las proteínas BST-2, Ets1 y VE-cadherina en respuesta a TNF a 4 y 8 h de estimulación y la reducción de los niveles de Ets1 al silenciar BST-2. Estos datos apoyan la existencia de una vía dependiente de NF- κ B, BST-2, Ets1, y VE-cadherina, importante para el mantenimiento de la integridad de las uniones intercelulares en un contexto inflamatorio. Sin embargo, BST-2 sigue aumentando sus niveles a 24 h de estimulación, mientras que los de Ets1 y VE-cadherina se reducen a este tiempo. Así, estos resultados también sugieren la presencia de un mecanismo de retrocontrol negativo de la inducción de Ets1 que podría estar operada por un represor de su promotor, como por ejemplo MafB (Sieweke et al., 1996). Además, podría existir un mecanismo sensor de los niveles de Ets1 que promoviera una inducción de BST-2 que a su vez tratara de “rescatar” los niveles de Ets1, lo cual concuerda con la subida de los niveles totales de BST-2 que se observan al silenciar Ets1. Hay que destacar que BST-2 no regula en nuestro sistema celular toda la respuesta inflamatoria. Los niveles de ICAM-1 no se reducen significativamente e incluso aumenta en ausencia de tetherina.

La vía anteriormente descrita favorecería la generación de una población intracelular de VE-cadherina que permitiría la reposición de la VE-cadherina que se internaliza y degrada desde la superficie celular. Sin embargo, el silenciamiento de BST-2, aunque debilita claramente la función de barrera en respuesta a TNF, no presenta ninguna alteración en la pérdida y recuperación de la función de barrera inducida por la depleción/reposición de calcio. Podríamos atribuir esta ausencia de efecto a un mecanismo de compensación mediado por proteínas cuya función pudiera ser redundante con la de VE-cadherina. En efecto, se han descrito recientemente varias moléculas capaces de remedar la función de VE-cadherina en la recuperación de la función de barrera, como por ejemplo Tie-2 (Frye et al., 2015), Esam (Sauteur et al., 2017) o incluso N-cadherina (Colás et al., datos no publicados del laboratorio).

3.2. Efecto de BST-2 sobre la integridad de VE-cadherina y la estabilización de los complejos de uniones adherentes

Por otro lado, hemos observado que la ausencia de BST-2 también conlleva una reducción de los niveles de VE-cadherina en la superficie celular, así como de la vida media de la VE-cadherina que se internaliza tras un estímulo disruptivo agudo. Además, tras la disrupción de la barrera endotelial, hemos observado un aumento de BST-2 en la fracción de proteína de superficie, lo que sugiere que esta alteración promueve tráfico de BST-2 desde su compartimento endosomal hasta la superficie, o al menos, la asociación de BST-2 con proteínas de la superficie, lo que sugiere que además de modular la respuesta inflamatoria, BST-2 podría participar también desde el punto de vista del tráfico intracelular y la organización de la membrana plasmática.

En efecto, se ha demostrado por un lado que BST-2, merced a su anclaje GPI, es un organizador de microdominios de membrana ricos en balsas lipídicas (Rollason et al., 2009; Billcliff et al., 2013). Por otro, se ha descrito que los complejos de VE-cadherina funcionales tienden a localizarse en este tipo de dominios (Baumgartner et al., 2014). Así, proponemos que BST-2 podría estar manteniendo la organización de las balsas lipídicas para favorecer la integridad de los complejos de membrana en un contexto inflamatorio, permitiendo de este modo la recuperación de la función de barrera endotelial tras la terminación del estímulo. BST-2 sería por tanto un factor capaz de inducir la resolución de la inflamación. De hecho, ya se publicó que BST-2 podía jugar un papel importante en este proceso por cuanto es capaz de reprimir el receptor ILT7, limitando así la producción de interferón en células dendríticas plasmacitoides (Cao et al., 2009).

Además, se ha demostrado recientemente que BST-2 es una proteína capaz de retener exosomas a nivel de la membrana celular (Edgar et al., 2016). Considerando que las vesículas positivas para VE-cadherina que viajan desde el citoplasma hasta fusionarse con la membrana se comportan de manera similar a los exosomas, no podemos excluir que BST-2 evite la liberación de dichas vesículas al medio y favorezca así la retención de VE-cadherina en la membrana celular.

También observamos que la formación de uniones ectópicas bajo las colonias bacterianas en células endoteliales infectadas por *Neisseria meningitidis* correlaciona con la expresión e inducción de BST-2 en dicha células. Observamos que VE-cadherina co-localiza con BST-2 en las estructuras en forma de “panal de abeja”, mientras que en células que no expresan BST-2, esta relocalización no se da. Estos datos sugieren por tanto que BST-2 puede ser necesaria para el mantenimiento de la integridad de VE-cadherina en un contexto en el que se induce la internalización y reciclaje de VE-cadherina desde y hacia la membrana celular.

3.3. Infección por virus, regulación negativa de BST-2 y VE-cadherina

Se ha demostrado recientemente que la infección de células endoteliales con el Herpesvirus asociado al Sarcoma de Kaposi induce la ubiquitinación y degradación de BST-2 (Mansouri et al., 2009), así como de VE-cadherina (Mansouri et al., 2008; Qian et al., 2008). Aunque los trabajos de Mansouri y colaboradores demuestran que la degradación de VE-cadherina estriba en la acción de la ubiquitina-ligasa K5 de la familia MARCH, no podemos excluir una reducción de los niveles de BST-2 como mecanismo adicional que redundaría en la pérdida de VE-cadherina. Así, la regulación negativa de BST-2 ejercida por numerosos virus (Mahauad-Fernandez y Okeoma, 2016) podría no sólo facilitar el “*spreading*” viral según los mecanismos ya descritos (Douglas et al., 2010), si no también comprometer la función de barrera del endotelio vascular, lo cual redundaría en la diseminación de las partículas virales en el organismo.

3.4. Asociación de BST-2 y Metaloproteinasas de matriz

Se ha demostrado que la degradación de VE-cadherina puede verse incrementada por la acción de metaloproteinasas de matriz como ADAM10 o ADAM17 (Dreymueller et al., 2012). Por lo tanto, no podemos excluir que TNF pueda regular la síntesis o la actividad de este tipo de proteasas, reduciéndose así la vida media de VE-cadherina a causa de los cortes

proteolíticos que puedan sufrir. En efecto, nuestro grupo ha observado recientemente una sinergia entre ADAM10 y el proteasoma en la degradación de VE-cadherina (García-Weber et al., datos no publicados). Por otro lado, Gu y colaboradores publicaron que la interacción de BST-2 con MT1-MMP limita la actividad de la metaloproteínasa MMP2 (Gu et al., 2012), lo que sugiere que la presencia de BST-2 podría limitar el procesamiento proteolítico de VE-cadherina, preservándose así la integridad de dicha molécula, así como la de los complejos de uniones adherentes.

3.5. BST-2 favorece la integridad vascular en vasos grandes

A lo largo de este trabajo, hemos observado que BST-2 favorece la integridad de los complejos de uniones intercelulares dependientes de VE-cadherina en un contexto inflamatorio en células endoteliales de la vena del cordón umbilical, es decir, de vasos grandes. Sin embargo, en células endoteliales microvasculares dermales, BST-2 no se expresa, lo cual concuerda con el hecho de que este tipo de endotelio es mucho más permeable y es aquel en el que se da un mayor tráfico de células entre el torrente sanguíneo y los tejidos. A esto se suma el hecho de que en células microvasculares, TNF induce un aumento de los niveles de metaloproteinasas de matriz como MMP12, las cuales podrían acelerar la degradación de VE-cadherina (Viemann et al., 2006).

Además, el mantenimiento de VE-cadherina a nivel de los complejos de uniones adherentes correlaciona con la supervivencia celular, lo cual constituiría un mecanismo adicional orientado hacia el mantenimiento de la integridad vascular. En efecto, se ha visto que la presencia de VE-cadherina es necesaria para evitar la apoptosis *in vivo* (Carmeliet et al., 1999), probablemente a través de la inducción de la proteína antiapoptótica Gas1 (Spagnuolo et al., 2004).

Por lo tanto, cuando se da una respuesta inflamatoria a nivel del organismo, la presencia de BST-2 únicamente en el endotelio de vasos grandes permitiría el mantenimiento de la integridad vascular allí donde los intercambios son mínimos. Sin embargo, la función de barrera se vería comprometida en el endotelio de vasos pequeños, allí donde no se expresa BST-2. De este modo, se favorecería el tráfico de células del sistema inmune y demás mediadores por cuanto la barrera endotelial sería menos íntegra.

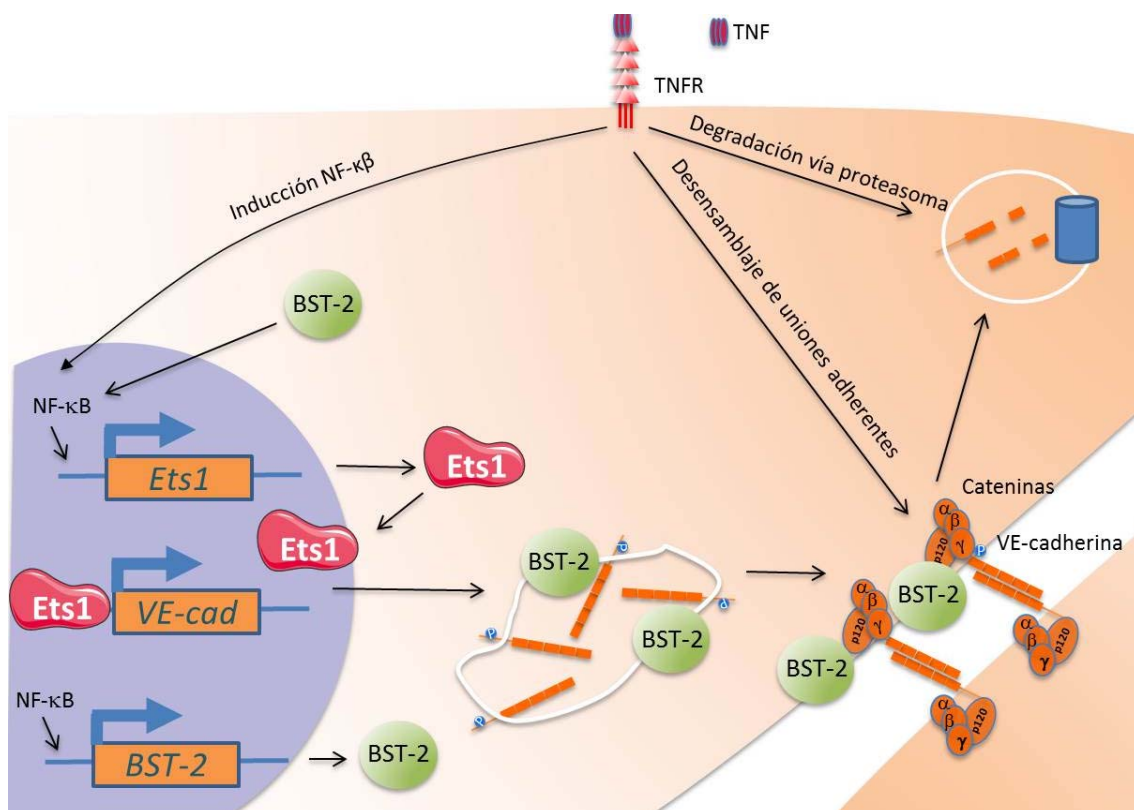


Ilustración 13: Modelo de la vía de señalización TNF, NF- κ B, Ets1, VE-cadherina, BST-2. En células endoteliales de vasos grandes –HUVEC–, TNF acelera la degradación de la VE-cadherina presente en superficie mediante el proteasoma y activa la vía NF- κ B, la cual induce la síntesis de Ets1 y su relocalización en el núcleo. Una vez allí, Ets1 promueve la síntesis de VE-cadherina, la cual se localiza en un “pool” intracelular que podrá reemplazar la VE-cadherina de membrana cuya degradación se ha acrecentado. BST-2 también se induce por la vía NF- κ B y podría estabilizar los complejos de VE-cadherina, evitando que disminuya la vida media de ésta. Además, BST-2 potenciaría la propia señalización de NF- κ B a través de su dominio YxY, retroalimentando así la síntesis de Ets1 y, por ende, la de VE-cadherina.

El trabajo aquí expuesto ha permitido poner de manifiesto la existencia de mecanismos celulares que son capaces de favorecer tanto la pérdida de función de barrera como el mantenimiento de la integridad del endotelio vascular en un contexto inflamatorio. Así, por un lado, la inducción de RhoB provoca un retraso en la recuperación de la función de barrera tras un estímulo disruptivo como la trombina en células microvasculares. Por otro, la inducción de BST-2 favorece el mantenimiento de la integridad de los complejos adherentes a múltiples niveles en el endotelio de vasos grandes y por tanto, también la resolución de la inflamación. Así, ambas proteínas serían buenos candidatos como posibles dianas terapéuticas para preservar la integridad del endotelio en un contexto inflamatorio.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. RhoB se expresa en el endotelio de vasos pequeños como las vénulas postcapilares humanas en tejidos con enfermedad inflamatoria intestinal y aumenta sus niveles en respuesta a TNF en células microvasculares humanas entre 3 y 5 veces.
2. RhoB regula la recuperación de la función de barrera en células microvasculares humanas. Inhibe la formación de extensiones de membrana y la actividad de la GTPasa Rac1, principal regulador de dichas extensiones. Las uniones intercelulares no son necesarias para esta función.
3. La estimulación de células endoteliales con TNF aumenta la tasa de degradación de VE-cadherina por vía proteasoma, disminuyendo la vida media de ésta.
4. TNF induce la síntesis de VE-cadherina en células endoteliales por la vía NF- κ B a través del factor de transcripción Ets1.
5. La aceleración de la tasa de reemplazo de VE-cadherina en células endoteliales humanas estimuladas por TNF provoca una disminución de los niveles totales de VE-cadherina en respuesta a un estímulo disruptivo, manteniéndose sin embargo constantes los niveles de superficie de dicha proteína.
6. BST-2 se induce en respuesta a TNF en células endoteliales humanas.
7. El silenciamiento génico de BST-2 sugiere que esta proteína media la inducción de la síntesis de VE-cadherina vía Ets1 y la salida de VE-cadherina a la membrana celular, favoreciéndose la integridad de la barrera endotelial tras un estímulo disruptivo.
8. BST-2 prolonga la vida media de VE-cadherina en un contexto inflamatorio.
9. BST-2 se induce en respuesta a la infección por *Neisseria meningitidis* en células endoteliales humanas y se relocaliza bajo las uniones ectópicas en forma de panal de abeja, co-localizando con VE-cadherina.

En resumen, concluimos que TNF reduce la función de barrera del endotelio vascular a través de la inducción de RhoB. En efecto, esta GTPasa inhibe la expansión de las células endoteliales tras un choque con trombina por medio de la alteración del tráfico intracelular de Rac1. Sin embargo, TNF también promueve la integridad del endotelio vascular en un contexto inflamatorio favoreciendo el mantenimiento de niveles adecuados de VE-cadherina en superficie mediante la inducción de Ets1 y BST-2.

Conclusions

1. RhoB is expressed in the endothelium of small vessels like human post-capillary venules in tissues with an intestinal inflammatory disease and increases its levels in response to TNF in human microvascular cells between 3- and 5-fold.
2. RhoB regulates barrier function recovery in human microvascular cells. It inhibits membrane protrusion formation by inhibiting Rac1 and, as a consequence, membrane protrusion formation. Intercellular junctions are not necessary for this function.
3. Endothelial cell stimulation with TNF increases the degradation rate of VE-cadherin in a proteasome-dependent manner, diminishing VE-cadherin half-life.
4. TNF induces VE-cadherin synthesis in endothelial cells via NF- κ B by means of Ets1 transcription factor.
5. The acceleration of VE-cadherin turnover in human endothelial cells stimulated with TNF induces a decrease of VE-cadherin total levels upon a disruptive stimulus. However, Surface VE-cadherin levels remain constant.
6. BST-2 is induced in response to TNF in human endothelial cells.
7. BST-2 silencing suggests that this protein induces VE-cadherin synthesis via Ets1 and VE-cadherin membrane targeting, favoring endothelial barrier integrity upon a disruptive stimulus.
8. BST-2 increases VE-cadherin half-life in an inflammatory context.
9. BST-2 is induced in human endothelial cells upon *Neisseria meningitidis* infection and relocates under honeycomb-like ectopic junctions, co-localizing with VE-cadherin.

To sum up, we conclude that TNF reduces endothelial barrier function by inducing RhoB. Indeed, this GTPase inhibits endothelial cells expansion upon a thrombin challenge by altering Rac1 intracellular trafficking. However, TNF also promotes vascular endothelial integrity in an inflammatory context by favoring the maintenance of VE-cadherin at the cell surface through Ets1 and BST-2.

BIBLIOGRAFÍA

- Abedin, Monika, y Nicole King. 2008. «The Premetazoan Ancestry of Cadherins». *Science (New York, N.Y.)* 319 (5865): 946-48. doi:10.1126/science.1151084.
- Abu Taha, Abdallah, Muna Taha, Jochen Seebach, y Hans-J. Schnittler. 2014. «ARP2/3-Mediated Junction-Associated Lamellipodia Control VE-Cadherin-Based Cell Junction Dynamics and Maintain Monolayer Integrity». *Molecular Biology of the Cell* 25 (2): 245-56. doi:10.1091/mbc.E13-07-0404.
- Abul Abbas, Andrew Lichtman, Shiv Pillai. 2008. *Inmunología Celular y Molecular*. Elsevier Saunders.
- Adamson, P., H. F. Paterson, y A. Hall. 1992. «Intracellular Localization of the P21rho Proteins». *The Journal of Cell Biology* 119 (3): 617-27.
- Ahrens, Thomas, Mireille Lambert, Olivier Pertz, Takako Sasaki, Therese Schulthess, René-Marc Mège, Rupert Timpl, y Jürgen Engel. 2003. «Homoassociation of VE-Cadherin Follows a Mechanism Common To “classical” cadherins». *Journal of Molecular Biology* 325 (4): 733-42.
- Aktories, K., y A. Hall. 1989. «Botulinum ADP-Ribosyltransferase C3: A New Tool to Study Low Molecular Weight GTP-Binding Proteins». *Trends in Pharmacological Sciences* 10 (10): 415-18.
- Amano, M., M. Ito, K. Kimura, Y. Fukata, K. Chihara, T. Nakano, Y. Matsuura, y K. Kaibuchi. 1996. «Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase)». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20246-49.
- Andrew, Amy J., Eri Miyagi, Sandra Kao, y Klaus Strebel. 2009. «The Formation of Cysteine-Linked Dimers of BST-2/Tetherin Is Important for Inhibition of HIV-1 Virus Release but Not for Sensitivity to Vpu». *Retrovirology* 6: 80. doi:10.1186/1742-4690-6-80.
- Angelini, Daniel J., Sang-Won Hyun, Dmitry N. Grigoryev, Pallavi Garg, Ping Gong, Ishwar S. Singh, Antonino Passaniti, Jeffery D. Hasday, y Simeon E. Goldblum. 2006. «TNF-Alpha Increases Tyrosine Phosphorylation of Vascular Endothelial Cadherin and Opens the Paracellular Pathway through Fyn Activation in Human Lung Endothelia». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 291 (6): L1232-1245. doi:10.1152/ajplung.00109.2006.
- Angus, Derek C., y Tom van der Poll. 2013. «Severe Sepsis and Septic Shock». *The New England Journal of Medicine* 369 (21): 2063. doi:10.1056/NEJMc1312359.
- Arnout, J., M. F. Hoylaerts, y H. R. Lijnen. 2006. «Haemostasis». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n.º 176 Pt 2: 1-41.
- Bäumer, Sebastian, Linda Keller, Astrid Holtmann, Ruth Funke, Benjamin August, Alexander Gamp, Hartwig Wolburg, Karen Wolburg-Buchholz, Urban Deutsch, y Dietmar Vestweber. 2006. «Vascular Endothelial Cell-Specific Phosphotyrosine Phosphatase (VE-PTP) Activity Is Required for Blood Vessel Development». *Blood* 107 (12): 4754-62. doi:10.1182/blood-2006-01-0141.

Baumgart, Daniel C., y William J. Sandborn. 2012. «Crohn's Disease». *The Lancet* 380 (9853): 1590-1605. doi:10.1016/S0140-6736(12)60026-9.

Baumgartner, Werner, Agnes Weth, Judith Gutberlet, Gregory Harms, y Klaus Groschner. 2014. «Localization of VE-Cadherin in Plasmalemmal Cholesterol Rich Microdomains and the Effects of Cholesterol Depletion on VE-Cadherin Mediated Cell-Cell Adhesion». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1841 (12): 1725-32. doi:10.1016/j.bbali.2014.08.016.

Bazzoni, G., O. M. Martinez-Estrada, F. Mueller, P. Nelboeck, G. Schmid, T. Bartfai, E. Dejana, y M. Brockhaus. 2000. «Homophilic Interaction of Junctional Adhesion Molecule». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (40): 30970-76. doi:10.1074/jbc.M003946200.

Bazzoni, Gianfranco, y Elisabetta Dejana. 2004. «Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis». *Physiological Reviews* 84 (3): 869-901. doi:10.1152/physrev.00035.2003.

Beatriz Marcos Ramiro. 2015. «La GTPasa endosomal RhoB regula la recuperación de la barrera endotelial durante la inflamación». Universidad Autónoma de Madrid.

Beltran, Pedro J., y John L. Bixby. 2003. «Receptor Protein Tyrosine Phosphatases as Mediators of Cellular Adhesion». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 8 (enero): d87-99.

Benn, Andreas, Clara Bredow, Isabel Casanova, Slobodan Vukičević, y Petra Knaus. 2016. «VE-cadherin facilitates BMP-induced endothelial cell permeability and signaling». *Journal of Cell Science* 129 (1): 206-18. doi:10.1242/jcs.179960.

Bennett, Jami, Jayasree Basivireddy, Anita Kollar, Kaan E. Biron, Peter Reickmann, Wilfred A. Jefferies, y Stephen McQuaid. 2010. «Blood-brain barrier disruption and enhanced vascular permeability in the multiple sclerosis model EAE». *Journal of Neuroimmunology* 229 (1-2): 180-91. doi:10.1016/j.jneuroim.2010.08.011.

Bernard, Sandra C., Nandi Simpson, Olivier Join-Lambert, Christian Federici, Marie-Pierre Laran-Chich, Nawal Maïssa, Haniaa Bouzinba-Ségar, et al. 2014. «Pathogenic Neisseria Meningitidis Utilizes CD147 for Vascular Colonization». *Nature Medicine* 20 (7): 725-31. doi:10.1038/nm.3563.

Beynon, H. L., D. O. Haskard, K. A. Davies, R. Haroutunian, y M. J. Walport. 1993. «Combinations of Low Concentrations of Cytokines and Acute Agonists Synergize in Increasing the Permeability of Endothelial Monolayers». *Clinical and Experimental Immunology* 91 (2): 314-19.

Billcliff, Peter G., Ruth Rollason, Ian Prior, Dylan M. Owen, Katharina Gaus, y George Banting. 2013. «CD317/Tetherin Is an Organiser of Membrane Microdomains». *Journal of Cell Science* 126 (Pt 7): 1553-64. doi:10.1242/jcs.112953.

Bird, I. N., V. Taylor, J. P. Newton, J. H. Spragg, D. L. Simmons, M. Salmon, y C. D. Buckley. 1999. «Homophilic PECAM-1(CD31) Interactions Prevent Endothelial Cell

Apoptosis but Do Not Support Cell Spreading or Migration». *Journal of Cell Science* 112 (Pt 12) (junio): 1989-97.

Birdsey, Graeme M., Nicola H. Dryden, Valerie Amsellem, Frank Gebhardt, Kapil Sahnan, Dorian O. Haskard, Elisabetta Dejana, Justin C. Mason, y Anna M. Randi. 2008. «Transcription Factor Erg Regulates Angiogenesis and Endothelial Apoptosis through VE-Cadherin». *Blood* 111 (7): 3498-3506. doi:10.1182/blood-2007-08-105346.

Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, et al. 1997. «A Metalloproteinase Disintegrin That Releases Tumour-Necrosis Factor-Alpha from Cells». *Nature* 385 (6618): 729-33. doi:10.1038/385729a0.

Blasius, Amanda L., Emanuele Giurisato, Marina Cella, Robert D. Schreiber, Andrey S. Shaw, y Marco Colonna. 2006. «Bone Marrow Stromal Cell Antigen 2 Is a Specific Marker of Type I IFN-Producing Cells in the Naive Mouse, but a Promiscuous Cell Surface Antigen Following IFN Stimulation». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 177 (5): 3260-65.

Bonazzi, Matteo, Esteban Veiga, Javier Pizarro-Cerdá, y Pascale Cossart. 2008. «Successive Post-Translational Modifications of E-Cadherin Are Required for InlA-Mediated Internalization of *Listeria Monocytogenes*». *Cellular Microbiology* 10 (11): 2208-22. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01200.x.

Bourne, H. R., D. A. Sanders, y F. McCormick. 1991. «The GTPase Superfamily: Conserved Structure and Molecular Mechanism». *Nature* 349 (6305): 117-27. doi:10.1038/349117a0.

Bousquet, E., O. Calvayrac, J. Mazières, I. Lajoie-Mazenc, N. Boubekur, G. Favre, y A. Pradines. 2016. «RhoB Loss Induces Rac1-Dependent Mesenchymal Cell Invasion in Lung Cells through PP2A Inhibition». *Oncogene* 35 (14): 1760-69. doi:10.1038/onc.2015.240.

Bousquet, Emilie, Julien Mazières, Maud Privat, Virginie Rizzati, Anne Casanova, Adeline Ledoux, Eliane Mery, Bettina Couderc, Gilles Favre, y Anne Pradines. 2009. «Loss of RhoB Expression Promotes Migration and Invasion of Human Bronchial Cells via Activation of AKT1». *Cancer Research* 69 (15): 6092-99. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-4147.

Bradley, J. R. 2008. «TNF-Mediated Inflammatory Disease». *The Journal of Pathology* 214 (2): 149-60. doi:10.1002/path.2287.

Bradley, J. R., S. Thiru, y J. S. Pober. 1995. «Disparate Localization of 55-Kd and 75-Kd Tumor Necrosis Factor Receptors in Human Endothelial Cells». *The American Journal of Pathology* 146 (1): 27-32.

Breier, G., F. Breviario, L. Caveda, R. Berthier, H. Schnürrch, U. Gotsch, D. Vestweber, W. Risau, y E. Dejana. 1996. «Molecular Cloning and Expression of Murine Vascular Endothelial-Cadherin in Early Stage Development of Cardiovascular System». *Blood* 87 (2): 630-41.

- Brenner, D. A., M. O'Hara, P. Angel, M. Chojkier, y M. Karin. 1989. «Prolonged Activation of Jun and Collagenase Genes by Tumour Necrosis Factor-Alpha». *Nature* 337 (6208): 661-63. doi:10.1038/337661a0.
- Busse, R., y I. Fleming. 2006. «Vascular Endothelium and Blood Flow». *Handbook of Experimental Pharmacology*, n.º 176 Pt 2: 43-78.
- Cabal-Hierro, Lucía, y Pedro S. Lazo. 2012. «Signal Transduction by Tumor Necrosis Factor Receptors». *Cellular Signalling* 24 (6): 1297-1305. doi:10.1016/j.cellsig.2012.02.006.
- Cai, Bishuang, Sai Srinivas Panapakkam Giridharan, Jing Zhang, Sugandha Saxena, Kriti Bahl, John A. Schmidt, Paul L. Sorgen, Wei Guo, Naava Naslavsky, y Steve Caplan. 2013. «Differential Roles of C-Terminal Eps15 Homology Domain Proteins as Vesiculators and Tubulators of Recycling Endosomes». *The Journal of Biological Chemistry* 288 (42): 30172-80. doi:10.1074/jbc.M113.488627.
- Cain, Robert J., Bart Vanhaesebroeck, y Anne J. Ridley. 2010. «The PI3K p110alpha Isoform Regulates Endothelial Adherens Junctions via Pyk2 and Rac1». *The Journal of Cell Biology* 188 (6): 863-76. doi:10.1083/jcb.200907135.
- Cao, Wei, Laura Bover, Minkwon Cho, Xiaoxia Wen, Shino Hanabuchi, Musheng Bao, David B. Rosen, et al. 2009. «Regulation of TLR7/9 Responses in Plasmacytoid Dendritic Cells by BST2 and ILT7 Receptor Interaction». *The Journal of Experimental Medicine* 206 (7): 1603-14. doi:10.1084/jem.20090547.
- Carmeliet, P., M. G. Lampugnani, L. Moons, F. Breviario, V. Compernelle, F. Bono, G. Balconi, et al. 1999. «Targeted Deficiency or Cytosolic Truncation of the VE-Cadherin Gene in Mice Impairs VEGF-Mediated Endothelial Survival and Angiogenesis». *Cell* 98 (2): 147-57.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore, y B. Williamson. 1975. «An Endotoxin-Induced Serum Factor That Causes Necrosis of Tumors». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72 (9): 3666-70.
- Cernuda-Morollón, Eva, y Anne J. Ridley. 2006. «Rho GTPases and Leukocyte Adhesion Receptor Expression and Function in Endothelial Cells». *Circulation Research* 98 (6): 757-67. doi:10.1161/01.RES.0000210579.35304.d3.
- Chichger, Havovi, Julie Braza, Huetran Duong, Geraldine Boni, y Elizabeth O. Harrington. 2016. «Select Rab GTPases Regulate the Pulmonary Endothelium via Endosomal Trafficking of Vascular Endothelial-Cadherin». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 54 (6): 769-81. doi:10.1165/rcmb.2015-0286OC.
- Chichger, Havovi, Julie Braza, Huetran Duong, Myranda Stark, y Elizabeth O. Harrington. 2015. «Neovascularization in the Pulmonary Endothelium Is Regulated by the Endosome: Rab4-Mediated Trafficking and p18-Dependent Signaling». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 309 (7): L700-709. doi:10.1152/ajplung.00235.2015.

- Chichger, Havovi, Huetran Duong, Julie Braza, y Elizabeth O. Harrington. 2015. «p18, a Novel Adaptor Protein, Regulates Pulmonary Endothelial Barrier Function via Enhanced Endocytic Recycling of VE-Cadherin». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 29 (3): 868-81. doi:10.1096/fj.14-257212.
- Chong, Deborah L. W., y Shiranee Sriskandan. 2011. «Pro-Inflammatory Mechanisms in Sepsis». *Contributions to Microbiology* 17: 86-107. doi:10.1159/000324022.
- Chrzanowska-Wodnicka, M., y K. Burridge. 1996. «Rho-Stimulated Contractility Drives the Formation of Stress Fibers and Focal Adhesions». *The Journal of Cell Biology* 133 (6): 1403-15.
- Citi, Sandra, Diego Guerrero, Domenica Spadaro, y Jimit Shah. 2014. «Epithelial Junctions and Rho Family GTPases: The Zonular Signalosome». *Small GTPases* 5 (4): 1-15. doi:10.4161/21541248.2014.973760.
- Collins, T., M. A. Read, A. S. Neish, M. Z. Whitley, D. Thanos, y T. Maniatis. 1995. «Transcriptional Regulation of Endothelial Cell Adhesion Molecules: NF-Kappa B and Cytokine-Inducible Enhancers». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 9 (10): 899-909.
- Corcoran, Aoife, y Thomas G. Cotter. 2013. «Redox Regulation of Protein Kinases». *The FEBS Journal* 280 (9): 1944-65. doi:10.1111/febs.12224.
- Cordenonsi, M., F. D'Atri, E. Hammar, D. A. Parry, J. Kendrick-Jones, D. Shore, y S. Citi. 1999. «Cingulin Contains Globular and Coiled-Coil Domains and Interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3, and Myosin». *The Journal of Cell Biology* 147 (7): 1569-82.
- Coughlin, S. R. 1999. «How the Protease Thrombin Talks to Cells». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (20): 11023-27.
- Coughlin, S.R. 2000. «Thrombin Signalling and Protease-Activated Receptors». *Nature* 407 (6801): 258-64. doi:10.1038/35025229.
- Coureuil, Mathieu, Sandrine Bourdoulous, Stefano Marullo, y Xavier Nassif. 2014. «Invasive Meningococcal Disease: A Disease of the Endothelial Cells». *Trends in Molecular Medicine* 20 (10): 571-78. doi:10.1016/j.molmed.2014.08.002.
- Coureuil, Mathieu, Hervé Lécuyer, Mark G. H. Scott, Cédric Boularan, Hervé Enslen, Magali Soyer, Guillaín Mikaty, Sandrine Bourdoulous, Xavier Nassif, y Stefano Marullo. 2010. «Meningococcus Hijacks a β 2-Adrenoceptor/ β -Arrestin Pathway to Cross Brain Microvasculature Endothelium». *Cell* 143 (7): 1149-60. doi:10.1016/j.cell.2010.11.035.
- Coureuil, Mathieu, Guillaín Mikaty, Florence Miller, Hervé Lécuyer, Christine Bernard, Sandrine Bourdoulous, Guillaume Duménil, et al. 2009. «Meningococcal Type IV Pili Recruit the Polarity Complex to Cross the Brain Endothelium». *Science (New York, N.Y.)* 325 (5936): 83-87. doi:10.1126/science.1173196.

Cremoux, P. de, C. Gauville, V. Closson, G. Linares, F. Calvo, A. Tavitian, y B. Olofsson. 1994. «EGF Modulation of the Ras-Related rhoB Gene Expression in Human Breast-Cancer Cell Lines». *International Journal of Cancer* 59 (3): 408-15.

Crisostomo, Paul R., Yue Wang, Troy A. Markel, Meijing Wang, Tim Lahm, y Daniel R. Meldrum. 2008. «Human Mesenchymal Stem Cells Stimulated by TNF-Alpha, LPS, or Hypoxia Produce Growth Factors by an NF Kappa B- but Not JNK-Dependent Mechanism». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 294 (3): C675-682. doi:10.1152/ajpcell.00437.2007.

Croft, Daniel R., y Michael F. Olson. 2011. «Transcriptional Regulation of Rho GTPase Signaling». *Transcription* 2 (5): 211-15. doi:10.4161/trns.2.5.16904.

Davis, Michael A., Renee C. Ireton, y Albert B. Reynolds. 2003. «A Core Function for p120-Catenin in Cadherin Turnover». *The Journal of Cell Biology* 163 (3): 525-34. doi:10.1083/jcb.200307111.

Dejana, E. 1997. «Endothelial Adherens Junctions: Implications in the Control of Vascular Permeability and Angiogenesis». *The Journal of Clinical Investigation* 100 (11 Suppl): S7-10.

Dejana, Elisabetta. 2004. «Endothelial Cell-Cell Junctions: Happy Together». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5 (4): 261-70. doi:10.1038/nrm1357.

Dejana, Elisabetta, y Dietmar Vestweber. 2013. «The Role of VE-Cadherin in Vascular Morphogenesis and Permeability Control». *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 116: 119-44. doi:10.1016/B978-0-12-394311-8.00006-6.

Deli, M. A., L. Descamps, M. P. Dehouck, R. Cecchelli, F. Joó, C. S. Abrahám, y G. Torpier. 1995. «Exposure of Tumor Necrosis Factor-Alpha to Luminal Membrane of Bovine Brain Capillary Endothelial Cells Cocultured with Astrocytes Induces a Delayed Increase of Permeability and Cytoplasmic Stress Fiber Formation of Actin». *Journal of Neuroscience Research* 41 (6): 717-26. doi:10.1002/jnr.490410602.

DeWire, Scott M., Seungkirl Ahn, Robert J. Lefkowitz, y Sudha K. Shenoy. 2007. «Beta-Arrestins and Cell Signaling». *Annual Review of Physiology* 69: 483-510. doi:10.1146/annurev.ph.69.013107.100021.

Di Paolo, Gilbert, y Pietro De Camilli. 2006. «Phosphoinositides in Cell Regulation and Membrane Dynamics». *Nature* 443 (7112): 651-57. doi:10.1038/nature05185.

Didsbury, J., R. F. Weber, G. M. Bokoch, T. Evans, y R. Snyderman. 1989. «Rac, a Novel Ras-Related Family of Proteins That Are Botulinum Toxin Substrates». *The Journal of Biological Chemistry* 264 (28): 16378-82.

Dietrich, Manuela, Sina Bartfeld, Rebekka Munke, Claudia Lange, Lesley A. Ogilvie, Alexandra Friedrich, y Thomas F. Meyer. 2011. «Activation of NF- κ B by Neisseria Gonorrhoeae Is Associated with Microcolony Formation and Type IV Pilus Retraction». *Cellular Microbiology* 13 (8): 1168-82. doi:10.1111/j.1462-5822.2011.01607.x.

Dixon, G. L., R. S. Heyderman, K. Kotovicz, D. L. Jack, S. R. Andersen, U. Vogel, M. Frosch, y N. Klein. 1999. «Endothelial Adhesion Molecule Expression and Its Inhibition by Recombinant Bactericidal/Permeability-Increasing Protein Are Influenced by the Capsulation and Lipooligosaccharide Structure of *Neisseria Meningitidis*». *Infection and Immunity* 67 (11): 5626-33.

Dominguez, Melissa G., Virginia C. Hughes, Li Pan, Mary Simmons, Christopher Daly, Keith Anderson, Irene Noguera-Troise, et al. 2007. «Vascular Endothelial Tyrosine Phosphatase (VE-PTP)-Null Mice Undergo Vasculogenesis but Die Embryonically because of Defects in Angiogenesis». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (9): 3243-48. doi:10.1073/pnas.0611510104.

Douglas, Janet L., Jean K. Gustin, Kasinath Viswanathan, Mandana Mansouri, Ashlee V. Moses, y Klaus Früh. 2010. «The Great Escape: Viral Strategies to Counter BST-2/Tetherin». *PLoS Pathogens* 6 (5): e1000913. doi:10.1371/journal.ppat.1000913.

Douglas, Janet L., Kasinath Viswanathan, Matthew N. McCarroll, Jean K. Gustin, Klaus Früh, y Ashlee V. Moses. 2009. «Vpu Directs the Degradation of the Human Immunodeficiency Virus Restriction Factor BST-2/Tetherin via a {beta}TrCP-Dependent Mechanism». *Journal of Virology* 83 (16): 7931-47. doi:10.1128/JVI.00242-09.

Doulet, Nicolas, Emmanuel Donnadieu, Marie-Pierre Laran-Chich, Florence Niedergang, Xavier Nassif, Pierre Olivier Couraud, y Sandrine Bourdoulous. 2006. «*Neisseria Meningitidis* Infection of Human Endothelial Cells Interferes with Leukocyte Transmigration by Preventing the Formation of Endothelial Docking Structures». *The Journal of Cell Biology* 173 (4): 627-37. doi:10.1083/jcb.200507128.

Drake, Matthew T., Jonathan D. Violin, Erin J. Whalen, James W. Wisler, Sudha K. Shenoy, y Robert J. Lefkowitz. 2008. «Beta-Arrestin-Biased Agonism at the beta2-Adrenergic Receptor». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (9): 5669-76. doi:10.1074/jbc.M708118200.

Dreymueller, Daniela, Jessica Pruessmeyer, Ester Groth, y Andreas Ludwig. 2012. «The Role of ADAM-Mediated Shedding in Vascular Biology». *European Journal of Cell Biology* 91 (6-7): 472-85. doi:10.1016/j.ejcb.2011.09.003.

Edgar, James R., Paul T. Manna, Shinichi Nishimura, George Banting, y Margaret S. Robinson. 2016. «Tetherin Is an Exosomal Tether». *eLife* 5 (septiembre). doi:10.7554/eLife.17180.

Élie Metchnikoff. 1892. *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation*. París: Masson.

Emmanuel, Catherine, Minh Huynh, Janice Matthews, Elizabeth Kelly, y Hans Zoellner. 2013. «TNF- α and TGF- β Synergistically Stimulate Elongation of Human Endothelial Cells without Transdifferentiation to Smooth Muscle Cell Phenotype». *Cytokine* 61 (1): 38-40. doi:10.1016/j.cyto.2012.09.017.

- Endo, Yukinori, Sharon Even-Ram, Roumen Pankov, Kazue Matsumoto, y Kenneth M. Yamada. 2006. «Inhibition of Rho GTPases by RNA Interference». *Methods in Enzymology* 406: 345-61. doi:10.1016/S0076-6879(06)06025-3.
- Esser, S., M. G. Lampugnani, M. Corada, E. Dejana, y W. Risau. 1998. «Vascular Endothelial Growth Factor Induces VE-Cadherin Tyrosine Phosphorylation in Endothelial Cells». *Journal of Cell Science* 111 (Pt 13) (julio): 1853-65.
- Etienne-Manneville, Sandrine, y Alan Hall. 2002. «Rho GTPases in Cell Biology». *Nature* 420 (6916): 629-35. doi:10.1038/nature01148.
- Fernandez-Borja, Mar, Lennert Janssen, Desiree Verwoerd, Peter Hordijk, y Jacques Neefjes. 2005. «RhoB Regulates Endosome Transport by Promoting Actin Assembly on Endosomal Membranes through Dia1». *Journal of Cell Science* 118 (Pt 12): 2661-70. doi:10.1242/jcs.02384.
- Fernández-Martín, Laura, Beatriz Marcos-Ramiro, Carolina L. Bigarella, Marion Graupera, Robert J. Cain, Natalia Reglero-Real, Anaïs Jiménez, et al. 2012. «Crosstalk between Reticular Adherens Junctions and Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 Regulates Endothelial Barrier Function». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 32 (8): e90-102. doi:10.1161/ATVBAHA.112.252080.
- Ferrero, E., A. Villa, M. E. Ferrero, E. Toninelli, J. R. Bender, R. Pardi, y M. R. Zocchi. 1996. «Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Vascular Leakage Involves PECAM1 Phosphorylation». *Cancer Research* 56 (14): 3211-15.
- Flemming, Sven, Natalie Burkard, Melanie Renschler, Franziska Vielmuth, Michael Meir, Martin Alexander Schick, Christian Wunder, et al. 2015. «Soluble VE-Cadherin Is Involved in Endothelial Barrier Breakdown in Systemic Inflammation and Sepsis». *Cardiovascular Research* 107 (1): 32-44. doi:10.1093/cvr/cvv144.
- Fournier, Patrick, Sylvie Dussault, Alfredo Fusco, Alain Rivard, y Isabelle Royal. 2016. «Tyrosine Phosphatase PTPRJ/DEP-1 Is an Essential Promoter of Vascular Permeability, Angiogenesis, and Tumor Progression». *Cancer Research* 76 (17): 5080-91. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1071.
- Franzén, Bo, Kristina Duvefelt, Carina Jonsson, Britta Engelhardt, Jan Ottervald, Monica Wickman, Yang Yang, y Ina Schuppe-Koistinen. 2003. «Gene and Protein Expression Profiling of Human Cerebral Endothelial Cells Activated with Tumor Necrosis Factor-Alpha». *Brain Research. Molecular Brain Research* 115 (2): 130-46.
- Fritsch, Ralph, Inge de Krijger, Kornelia Fritsch, Roger George, Beth Reason, Madhu S. Kumar, Markus Diefenbacher, Gordon Stamp, y Julian Downward. 2013. «RAS and RHO Families of GTPases Directly Regulate Distinct Phosphoinositide 3-Kinase Isoforms». *Cell* 153 (5): 1050-63. doi:10.1016/j.cell.2013.04.031.
- Fritz, G., R. Gnad, y B. Kaina. 1999. «Cell and Tissue-Type Specific Expression of Ras-Related GTPase RhoB». *Anticancer Research* 19 (3A): 1681-88.

- Frye, Maike, Martina Dierkes, Verena Küppers, Matthias Vockel, Janina Tomm, Dagmar Zeuschner, Jan Rossaint, et al. 2015. «Interfering with VE-PTP Stabilizes Endothelial Junctions in Vivo via Tie-2 in the Absence of VE-Cadherin». *The Journal of Experimental Medicine* 212 (13): 2267-87. doi:10.1084/jem.20150718.
- Fujita, Hideaki, Keiko Fujimoto, Kenzo Tokunaga, y Yoshitaka Tanaka. 2012. «Intracellular Logistics of BST-2/Tetherin». *Current HIV Research* 10 (4): 321-26.
- Gampel, A., P. J. Parker, y H. Mellor. 1999. «Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor Traffic by the Small GTPase rhoB». *Current Biology: CB* 9 (17): 955-58.
- Gao, B., T. M. Curtis, F. A. Blumenstock, F. L. Minnear, y T. M. Saba. 2000. «Increased Recycling of (alpha)5(beta)1 Integrins by Lung Endothelial Cells in Response to Tumor Necrosis Factor». *Journal of Cell Science* 113 Pt 2 (enero): 247-57.
- García-Weber, Diego, y Jaime Millán. 2016. «Parallels between Single Cell Migration and Barrier Formation: The Case of RhoB and Rac1 Trafficking». *Small GTPases*, septiembre, 0. doi:10.1080/21541248.2016.1231655.
- Gavard, Julie, y J. Silvio Gutkind. 2006. «VEGF Controls Endothelial-Cell Permeability by Promoting the Beta-Arrestin-Dependent Endocytosis of VE-Cadherin». *Nature Cell Biology* 8 (11): 1223-34. doi:10.1038/ncb1486.
- Gentil-dit-Maurin, Alice, Stella Oun, Sébastien Almagro, Stéphanie Bouillot, Marie Courçon, Ruth Linnepe, Dietmar Vestweber, Philippe Huber, y Emmanuelle Tillet. 2010. «Unraveling the Distinct Distributions of VE- and N-Cadherins in Endothelial Cells: A Key Role for p120-Catenin». *Experimental Cell Research* 316 (16): 2587-99. doi:10.1016/j.yexcr.2010.06.015.
- Gory, S., J. Dalmon, M. H. Prandini, T. Kortulewski, Y. de Launoit, y P. Huber. 1998. «Requirement of a GT Box (Sp1 Site) and Two Ets Binding Sites for Vascular Endothelial Cadherin Gene Transcription». *The Journal of Biological Chemistry* 273 (12): 6750-55.
- Goto, T., S. J. Kennel, M. Abe, M. Takishita, M. Kosaka, A. Solomon, y S. Saito. 1994. «A Novel Membrane Antigen Selectively Expressed on Terminally Differentiated Human B Cells». *Blood* 84 (6): 1922-30.
- Grell, M., E. Douni, H. Wajant, M. Löhden, M. Clauss, B. Maxeiner, S. Georgopoulos, et al. 1995. «The Transmembrane Form of Tumor Necrosis Factor Is the Prime Activating Ligand of the 80 kDa Tumor Necrosis Factor Receptor». *Cell* 83 (5): 793-802.
- Gu, Gongping, Dejian Zhao, Ziming Yin, y Ping Liu. 2012. «BST-2 Binding with Cellular MT1-MMP Blocks Cell Growth and Migration via Decreasing MMP2 Activity». *Journal of Cellular Biochemistry* 113 (3): 1013-21. doi:10.1002/jcb.23433.
- Gumbiner, B. M. 1996. «Cell Adhesion: The Molecular Basis of Tissue Architecture and Morphogenesis». *Cell* 84 (3): 345-57.

- Hall, A. 1998. «Rho GTPases and the Actin Cytoskeleton». *Science (New York, N.Y.)* 279 (5350): 509-14.
- Hatta, K., A. Nose, A. Nagafuchi, y M. Takeichi. 1988. «Cloning and Expression of cDNA Encoding a Neural Calcium-Dependent Cell Adhesion Molecule: Its Identity in the Cadherin Gene Family». *The Journal of Cell Biology* 106 (3): 873-81.
- Heasman, Sarah J., y Anne J. Ridley. 2008. «Mammalian Rho GTPases: New Insights into Their Functions from in Vivo Studies». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9 (9): 690-701. doi:10.1038/nrm2476.
- Herron, Crystal R., Anthony M. Lowery, Patricia R. Hollister, Albert B. Reynolds, y Peter A. Vincent. 2011. «p120 Regulates Endothelial Permeability Independently of Its NH2 Terminus and Rho Binding». *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 300 (1): H36-48. doi:10.1152/ajpheart.00812.2010.
- Hinz, Andreas, Nolwenn Miguet, Ganesh Natrajan, Yoshiko Usami, Hikaru Yamanaka, Patricia Renesto, Bettina Hartlieb, et al. 2010. «Structural Basis of HIV-1 Tethering to Membranes by the BST-2/Tetherin Ectodomain». *Cell Host & Microbe* 7 (4): 314-23. doi:10.1016/j.chom.2010.03.005.
- Hiroki, Oda. 2012. «Evolution of the Cadherin-Catenin Complex». *Sub-Cellular Biochemistry* 60: 9-35. doi:10.1007/978-94-007-4186-7_2.
- Hocking, D. C., P. G. Phillips, T. J. Ferro, y A. Johnson. 1990. «Mechanisms of Pulmonary Edema Induced by Tumor Necrosis Factor-Alpha». *Circulation Research* 67 (1): 68-77.
- Huang, M., y G. C. Prendergast. 2006. «RhoB in Cancer Suppression». *Histology and Histopathology* 21 (2): 213-18.
- Hulpiau, Paco, y Frans van Roy. 2011. «New Insights into the Evolution of Metazoan Cadherins». *Molecular Biology and Evolution* 28 (1): 647-57. doi:10.1093/molbev/msq233.
- Huveneers, Stephan, Joppe Oldenburg, Emma Spanjaard, Gerard van der Krogt, Ilya Grigoriev, Anna Akhmanova, Holger Rehmann, y Johan de Rooij. 2012. «Vinculin Associates with Endothelial VE-Cadherin Junctions to Control Force-Dependent Remodeling». *The Journal of Cell Biology* 196 (5): 641-52. doi:10.1083/jcb.201108120.
- Iacono, Kathryn T., Amy L. Brown, Mark I. Greene, y Sandra J. Saouaf. 2007. «CD147 Immunoglobulin Superfamily Receptor Function and Role in Pathology». *Experimental and Molecular Pathology* 83 (3): 283-95. doi:10.1016/j.yexmp.2007.08.014.
- Ilan, N., L. Cheung, E. Pinter, y J. A. Madri. 2000. «Platelet-Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (CD31), a Scaffolding Molecule for Selected Catenin Family Members Whose Binding Is Mediated by Different Tyrosine and Serine/Threonine Phosphorylation». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (28): 21435-43. doi:10.1074/jbc.M001857200.

- Ilan, N., S. Mahooti, D. L. Rimm, y J. A. Madri. 1999. «PECAM-1 (CD31) Functions as a Reservoir for and a Modulator of Tyrosine-Phosphorylated Beta-Catenin». *Journal of Cell Science* 112 Pt 18 (septiembre): 3005-14.
- Janvier, Katy, Annegret Pelchen-Matthews, Jean-Baptiste Renaud, Marina Caillet, Mark Marsh, y Clarisse Berlioz-Torrent. 2011. «The ESCRT-0 Component HRS Is Required for HIV-1 Vpu-Mediated BST-2/Tetherin down-Regulation». *PLoS Pathogens* 7 (2): e1001265. doi:10.1371/journal.ppat.1001265.
- Johari, Vandita, y Chandravathi Loke. 2012. «Brief Overview of the Coagulation Cascade». *Disease-a-Month: DM* 58 (8): 421-23. doi:10.1016/j.disamonth.2012.04.004.
- Johnson, K., Y. Choi, E. DeGroot, I. Samuels, A. Creasey, y L. Aarden. 1998. «Potential Mechanisms for a Proinflammatory Vascular Cytokine Response to Coagulation Activation». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 160 (10): 5130-35.
- Jones, Matthew C., Patrick T. Caswell, y Jim C. Norman. 2006. «Endocytic Recycling Pathways: Emerging Regulators of Cell Migration». *Current Opinion in Cell Biology* 18 (5): 549-57. doi:10.1016/j.ceb.2006.08.003.
- Julius Cohnheim. 1882. «Lectures on General Pathology».
- Kaibuchi, K., S. Kuroda, y M. Amano. 1999. «Regulation of the Cytoskeleton and Cell Adhesion by the Rho Family GTPases in Mammalian Cells». *Annual Review of Biochemistry* 68: 459-86. doi:10.1146/annurev.biochem.68.1.459.
- Karlsson, R., E. D. Pedersen, Z. Wang, y Cord Brakebusch. 2009. «Rho GTPase Function in Tumorigenesis». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1796 (2): 91-98. doi:10.1016/j.bbcan.2009.03.003.
- Kawai, Shigeto, Yumiko Azuma, Etsuko Fujii, Kou Furugaki, Shuji Ozaki, Toshio Matsumoto, Masaaki Kosaka, y Hisafumi Yamada-Okabe. 2008. «Interferon-Alpha Enhances CD317 Expression and the Antitumor Activity of Anti-CD317 Monoclonal Antibody in Renal Cell Carcinoma Xenograft Models». *Cancer Science* 99 (12): 2461-66. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00968.x.
- Keller, Christian W., Claudia Fokken, Stuart G. Turville, Anna Lünemann, Jens Schmidt, Christian Münz, y Jan D. Lünemann. 2011. «TNF-Alpha Induces Macroautophagy and Regulates MHC Class II Expression in Human Skeletal Muscle Cells». *The Journal of Biological Chemistry* 286 (5): 3970-80. doi:10.1074/jbc.M110.159392.
- Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, et al. 1996. «Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase)». *Science (New York, N.Y.)* 273 (5272): 245-48.
- King, Nicole. 2004. «The Unicellular Ancestry of Animal Development». *Developmental Cell* 7 (3): 313-25. doi:10.1016/j.devcel.2004.08.010.

- King, Nicole, Christopher T. Hittinger, y Sean B. Carroll. 2003. «Evolution of Key Cell Signaling and Adhesion Protein Families Predates Animal Origins». *Science (New York, N.Y.)* 301 (5631): 361-63. doi:10.1126/science.1083853.
- Kirk, John, Jonnie Plumb, Meenakshi Mirakhur, y Stephen McQuaid. 2003. «Tight Junctional Abnormality in Multiple Sclerosis White Matter Affects All Calibres of Vessel and Is Associated with Blood-Brain Barrier Leakage and Active Demyelination». *The Journal of Pathology* 201 (2): 319-27. doi:10.1002/path.1434.
- Kobayashi, Satomi, Toshiharu Yamashita, Kinuko Ohneda, Masumi Nagano, Kenichi Kimura, Hideto Nakai, Lorenz Poellinger, y Osamu Ohneda. 2015. «Hypoxia-Inducible Factor-3 α Promotes Angiogenic Activity of Pulmonary Endothelial Cells by Repressing the Expression of the VE-Cadherin Gene». *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* 20 (3): 224-41. doi:10.1111/gtc.12215.
- Konior, Anna, Agata Schramm, Marta Czesnikiewicz-Guzik, y Tomasz J. Guzik. 2014. «NADPH Oxidases in Vascular Pathology». *Antioxidants & Redox Signaling* 20 (17): 2794-2814. doi:10.1089/ars.2013.5607.
- Kroon, Jeffrey, Simon Tol, Sven van Amstel, Judith A. Elias, y Mar Fernandez-Borja. 2013. «The Small GTPase RhoB Regulates TNF α Signaling in Endothelial Cells». *PLoS One* 8 (9): e75031. doi:10.1371/journal.pone.0075031.
- Kupzig, Sabine, Viktor Korolchuk, Ruth Rollason, Anna Sugden, Andrew Wilde, y George Banting. 2003. «Bst-2/HM1.24 Is a Raft-Associated Apical Membrane Protein with an Unusual Topology». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 4 (10): 694-709.
- Lämmermann, Tim, y Ronald N. Germain. 2014. «The Multiple Faces of Leukocyte Interstitial Migration». *Seminars in Immunopathology* 36 (2): 227-51. doi:10.1007/s00281-014-0418-8.
- Lampugnani, M. G., y E. Dejana. 1997. «Interendothelial Junctions: Structure, Signalling and Functional Roles». *Current Opinion in Cell Biology* 9 (5): 674-82.
- Lampugnani, M. G., M. Resnati, M. Raiteri, R. Pigott, A. Pisacane, G. Houen, L. P. Ruco, y E. Dejana. 1992. «A Novel Endothelial-Specific Membrane Protein Is a Marker of Cell-Cell Contacts». *The Journal of Cell Biology* 118 (6): 1511-22.
- Lampugnani, Maria Grazia, Fabrizio Orsenigo, Maria Cristina Gagliani, Carlo Tacchetti, y Elisabetta Dejana. 2006. «Vascular Endothelial Cadherin Controls VEGFR-2 Internalization and Signaling from Intracellular Compartments». *The Journal of Cell Biology* 174 (4): 593-604. doi:10.1083/jcb.200602080.
- Lappalainen, P., y D. G. Drubin. 1997. «Cofilin Promotes Rapid Actin Filament Turnover in Vivo». *Nature* 388 (6637): 78-82. doi:10.1038/40418.
- Le Bras, A., F. Lionneton, V. Mattot, E. Lelièvre, B. Caetano, N. Spruyt, y F. Soncin. 2007. «HIF-2 α Specifically Activates the VE-Cadherin Promoter Independently of Hypoxia

and in Synergy with Ets-1 through Two Essential ETS-Binding Sites». *Oncogene* 26 (53): 7480-89. doi:10.1038/sj.onc.1210566.

Le Clainche, Christophe, y Marie-France Carlier. 2008. «Regulation of Actin Assembly Associated with Protrusion and Adhesion in Cell Migration». *Physiological Reviews* 88 (2): 489-513. doi:10.1152/physrev.00021.2007.

Le Guelte, Armelle, y Julie Gavard. 2011. «Role of Endothelial Cell-Cell Junctions in Endothelial Permeability». *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 763: 265-79. doi:10.1007/978-1-61779-191-8_18.

Le, Tam Luan, Shannon R. Joseph, Alpha S. Yap, y Jennifer L. Stow. 2002. «Protein Kinase C Regulates Endocytosis and Recycling of E-Cadherin». *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 283 (2): C489-499. doi:10.1152/ajpcell.00566.2001.

Lelièvre, E., V. Mattot, P. Huber, B. Vandenbunder, y F. Soncin. 2000. «ETS1 Lowers Capillary Endothelial Cell Density at Confluence and Induces the Expression of VE-Cadherin». *Oncogene* 19 (20): 2438-46. doi:10.1038/sj.onc.1203563.

Levi, Marcel, Tom van der Poll, y Marcus Schultz. 2012. «Infection and Inflammation as Risk Factors for Thrombosis and Atherosclerosis». *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 38 (5): 506-14. doi:10.1055/s-0032-1305782.

Li, Jun, Xiao-Ming Zha, Rong Wang, Xiao-Dong Li, Bei Xu, Yan-Jie Xu, y Yong-Mei Yin. 2012. «Regulation of CD44 Expression by Tumor Necrosis Factor- α and Its Potential Role in Breast Cancer Cell Migration». *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* 66 (2): 144-50. doi:10.1016/j.biopha.2011.11.021.

Li, Sam X., Bradley S. Barrett, Kejun Guo, y Mario L. Santiago. 2016. «Tetherin/BST-2: Restriction Factor or Immunomodulator?» *Current HIV Research* 14 (3): 235-46.

Li, Xueyi, Dora Kaloyanova, Martin van Eijk, Ruud Eerland, Gisou van der Goot, Viola Oorschot, Judith Klumperman, et al. 2007. «Involvement of a Golgi-Resident GPI-Anchored Protein in Maintenance of the Golgi Structure». *Molecular Biology of the Cell* 18 (4): 1261-71. doi:10.1091/mbc.E06-03-0236.

Lim, Ratana, y Martha Lappas. 2015. «Slit2 Exerts Anti-Inflammatory Actions in Human Placenta and Is Decreased with Maternal Obesity». *American Journal of Reproductive Immunology (New York, N.Y.: 1989)* 73 (1): 66-78. doi:10.1111/aji.12334.

London, Nyall R., y Dean Y. Li. 2011. «Robo4-Dependent Slit Signaling Stabilizes the Vasculature during Pathologic Angiogenesis and Cytokine Storm». *Current Opinion in Hematology* 18 (3): 186-90. doi:10.1097/MOH.0b013e328345a4b9.

Lu, Zi-Yuan, Wan-Cheng Chen, Yong-Hua Li, Li Li, Hang Zhang, Yan Pang, Zhi-Fang Xiao, Hao-Wen Xiao, y Yang Xiao. 2016. «TNF- α Enhances Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via the NF- κ B, ERK and JNK Signaling Pathways». *Molecular Medicine Reports* 14 (1): 643-48. doi:10.3892/mmr.2016.5314.

- Madaule, P., y R. Axel. 1985. «A Novel Ras-Related Gene Family». *Cell* 41 (1): 31-40.
- Madge, L. A., y J. S. Pober. 2001. «TNF Signaling in Vascular Endothelial Cells». *Experimental and Molecular Pathology* 70 (3): 317-25. doi:10.1006/exmp.2001.2368.
- Maekawa, M., T. Ishizaki, S. Boku, N. Watanabe, A. Fujita, A. Iwamatsu, T. Obinata, K. Ohashi, K. Mizuno, y S. Narumiya. 1999. «Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton through Protein Kinases ROCK and LIM-Kinase». *Science (New York, N.Y.)* 285 (5429): 895-98.
- Mahauad-Fernandez, Wadie D., y Chioma M. Okeoma. 2016. «The Role of BST-2/Tetherin in Host Protection and Disease Manifestation». *Immunity, Inflammation and Disease* 4 (1): 4-23. doi:10.1002/iid3.92.
- Mahla, Ranjeet Singh, Madhava C. Reddy, D. Vijaya Raghava Prasad, y Himanshu Kumar. 2013. «Sweeten PAMPs: Role of Sugar Complexed PAMPs in Innate Immunity and Vaccine Biology». *Frontiers in Immunology* 4: 248. doi:10.3389/fimmu.2013.00248.
- Majno, G. 1975. «The Healing Hand - Man and wound in the ancient world». *Cambridge, MA. Harvard University Press.*
- Malissein, Emilie, Elise Meunier, Isabelle Lajoie-Mazenc, Claire Médale-Giamarchi, Florence Dalenc, y Sophie F. Doisneau-Sixou. 2013. «RhoA and RhoC Differentially Modulate Estrogen Receptor α Recruitment, Transcriptional Activities, and Expression in Breast Cancer Cells (MCF-7)». *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 139 (12): 2079-88. doi:10.1007/s00432-013-1533-y.
- Mannell, Hanna, Nicole Hellwig, Torsten Gloe, Christian Plank, Hae-Young Sohn, Leopold Groesser, Barbara Walzog, Ulrich Pohl, y Florian Krotz. 2008. «Inhibition of the Tyrosine Phosphatase SHP-2 Suppresses Angiogenesis in Vitro and in Vivo». *Journal of Vascular Research* 45 (2): 153-63. doi:10.1159/000110081.
- Mansouri, Mandana, Patrick P. Rose, Ashlee V. Moses, y Klaus Früh. 2008. «Remodeling of Endothelial Adherens Junctions by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus». *Journal of Virology* 82 (19): 9615-28. doi:10.1128/JVI.02633-07.
- Mansouri, Mandana, Kasinath Viswanathan, Janet L. Douglas, Jennie Hines, Jean Gustin, Ashlee V. Moses, y Klaus Früh. 2009. «Molecular Mechanism of BST2/Tetherin Downregulation by K5/MIR2 of Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus». *Journal of Virology* 83 (19): 9672-81. doi:10.1128/JVI.00597-09.
- Marcos-Ramiro, B., D. García-Weber, y J. Millán. 2014. «TNF-Induced Endothelial Barrier Disruption: Beyond Actin and Rho». *Thrombosis and Haemostasis* 112 (6): 1088-1102. doi:10.1160/TH14-04-0299.
- Marcos-Ramiro, Beatriz, Diego García-Weber, Susana Barroso, Jorge Feito, María C. Ortega, Eva Cernuda-Morollón, Natalia Reglero-Real, et al. 2016. «RhoB Controls Endothelial Barrier Recovery by Inhibiting Rac1 Trafficking to the Cell Border». *The Journal of Cell Biology* 213 (3): 385-402. doi:10.1083/jcb.201504038.

- Marcos-Ramiro, Beatriz, Pedro Oliva Nacarino, Esther Serrano-Pertierra, Miguel Ángel Blanco-Gelaz, Babette B. Weksler, Ignacio A. Romero, Pierre O. Couraud, et al. 2014. «Microparticles in multiple sclerosis and clinically isolated syndrome: effect on endothelial barrier function». *BMC Neuroscience* 15: 110. doi:10.1186/1471-2202-15-110.
- Martínez-Estrada, Ofelia M., Luca Manzi, Paolo Tonetti, Elisabetta Dejana, y Gianfranco Bazzoni. 2005. «Opposite Effects of Tumor Necrosis Factor and Soluble Fibronectin on Junctional Adhesion Molecule-A in Endothelial Cells». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 288 (6): L1081-1088. doi:10.1152/ajplung.00289.2004.
- Martorell, Lluís, José Martínez-González, Cristina Rodríguez, Maurizio Gentile, Olivier Calvayrac, y Lina Badimon. 2008. «Thrombin and Protease-Activated Receptors (PARs) in Atherothrombosis». *Thrombosis and Haemostasis* 99 (2): 305-15. doi:10.1160/TH07-08-0481.
- Masuyama, Naoko, Toshio Kuronita, Rika Tanaka, Tomonori Muto, Yuko Hirota, Azusa Takigawa, Hideaki Fujita, Yoshinori Aso, Jun Amano, y Yoshitaka Tanaka. 2009. «HM1.24 Is Internalized from Lipid Rafts by Clathrin-Mediated Endocytosis through Interaction with Alpha-Adaptin». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (23): 15927-41. doi:10.1074/jbc.M109.005124.
- McKenzie, Jenny A. G., y Anne J. Ridley. 2007. «Roles of Rho/ROCK and MLCK in TNF-Alpha-Induced Changes in Endothelial Morphology and Permeability». *Journal of Cellular Physiology* 213 (1): 221-28. doi:10.1002/jcp.21114.
- McMahon, Harvey T., y Emmanuel Boucrot. 2011. «Molecular Mechanism and Physiological Functions of Clathrin-Mediated Endocytosis». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 12 (8): 517-33. doi:10.1038/nrm3151.
- Mechtcheriakova, Diana, Martin Svoboda, Anastasia Meshcheryakova, y Erika Jensen-Jarolim. 2012. «Activation-Induced Cytidine Deaminase (AID) Linking Immunity, Chronic Inflammation, and Cancer». *Cancer Immunology, Immunotherapy: CII* 61 (9): 1591-98. doi:10.1007/s00262-012-1255-z.
- Medzhitov, Ruslan. 2010. «Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame». *Cell* 140 (6): 771-76. doi:10.1016/j.cell.2010.03.006.
- Mehta, Dolly, y Asrar B. Malik. 2006. «Signaling Mechanisms Regulating Endothelial Permeability». *Physiological Reviews* 86 (1): 279-367. doi:10.1152/physrev.00012.2005.
- Millán, Jaime, Robert J. Cain, Natalia Reglero-Real, Carolina Bigarella, Beatriz Marcos-Ramiro, Laura Fernández-Martín, Isabel Correas, y Anne J. Ridley. 2010. «Adherens Junctions Connect Stress Fibres between Adjacent Endothelial Cells». *BMC Biology* 8: 11. doi:10.1186/1741-7007-8-11.
- Monaghan-Benson, Elizabeth, y Keith Burridge. 2009. «The Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Microvascular Permeability Requires Rac and Reactive Oxygen Species». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (38): 25602-11. doi:10.1074/jbc.M109.009894.

- Mong, Phyllus Y., y Qin Wang. 2009. «Activation of Rho Kinase Isoforms in Lung Endothelial Cells during Inflammation». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 182 (4): 2385-94. doi:10.4049/jimmunol.0802811.
- Morita, K., H. Sasaki, M. Furuse, y S. Tsukita. 1999. «Endothelial Claudin: Claudin-5/TMVCF Constitutes Tight Junction Strands in Endothelial Cells». *The Journal of Cell Biology* 147 (1): 185-94.
- Munemitsu, S., M. A. Innis, R. Clark, F. McCormick, A. Ullrich, y P. Polakis. 1990. «Molecular Cloning and Expression of a G25K cDNA, the Human Homolog of the Yeast Cell Cycle Gene CDC42». *Molecular and Cellular Biology* 10 (11): 5977-82.
- Murakami, T., C. Mataki, C. Nagao, M. Umetani, Y. Wada, M. Ishii, S. Tsutsumi, et al. 2000. «The Gene Expression Profile of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Stimulated by Tumor Necrosis Factor Alpha Using DNA Microarray Analysis». *Journal of Atherosclerosis and Thrombosis* 7 (1): 39-44.
- Murfee, Walter L., Thomas C. Skalak, y Shayn M. Peirce. 2005. «Differential Arterial/Venous Expression of NG2 Proteoglycan in Perivascular Cells along Microvessels: Identifying a Venule-Specific Phenotype». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 12 (2): 151-60. doi:10.1080/10739680590904955.
- Narumiya, S. 1996. «The Small GTPase Rho: Cellular Functions and Signal Transduction». *Journal of Biochemistry* 120 (2): 215-28.
- Neil, Stuart J. D., Trinity Zang, y Paul D. Bieniasz. 2008. «Tetherin Inhibits Retrovirus Release and Is Antagonized by HIV-1 Vpu». *Nature* 451 (7177): 425-30. doi:10.1038/nature06553.
- Nelson, W. James, y Roel Nusse. 2004. «Convergence of Wnt, Beta-Catenin, and Cadherin Pathways». *Science (New York, N.Y.)* 303 (5663): 1483-87. doi:10.1126/science.1094291.
- Nieset, J. E., A. R. Redfield, F. Jin, K. A. Knudsen, K. R. Johnson, y M. J. Wheelock. 1997. «Characterization of the Interactions of Alpha-Catenin with Alpha-Actinin and Beta-Catenin/Plakoglobin». *Journal of Cell Science* 110 (Pt 8) (abril): 1013-22.
- Nobes, C. D., y A. Hall. 1995. «Rho, Rac, and cdc42 GTPases Regulate the Assembly of Multimolecular Focal Complexes Associated with Actin Stress Fibers, Lamellipodia, and Filopodia». *Cell* 81 (1): 53-62.
- Nottebaum, Astrid F., Giuseppe Cagna, Mark Winderlich, Alexander C. Gamp, Ruth Linnepe, Christian Polaschegg, Kristina Filippova, et al. 2008. «VE-PTP Maintains the Endothelial Barrier via Plakoglobin and Becomes Dissociated from VE-Cadherin by Leukocytes and by VEGF». *The Journal of Experimental Medicine* 205 (12): 2929-45. doi:10.1084/jem.20080406.
- Nwariaku, Fiemu E., Zijuan Liu, Xudong Zhu, Richard H. Turnage, George A. Sarosi, y Lance S. Terada. 2002. «Tyrosine Phosphorylation of Vascular Endothelial Cadherin and the Regulation of Microvascular Permeability». *Surgery* 132 (2): 180-85.

- Oda, Hiroki, Kunifumi Tagawa, y Yasuko Akiyama-Oda. 2005. «Diversification of Epithelial Adherens Junctions with Independent Reductive Changes in Cadherin Form: Identification of Potential Molecular Synapomorphies among Bilaterians». *Evolution & Development* 7 (5): 376-89. doi:10.1111/j.1525-142X.2005.05043.x.
- Ohtomo, T., Y. Sugamata, Y. Ozaki, K. Ono, Y. Yoshimura, S. Kawai, Y. Koishihara, et al. 1999. «Molecular Cloning and Characterization of a Surface Antigen Preferentially Overexpressed on Multiple Myeloma Cells». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 258 (3): 583-91. doi:10.1006/bbrc.1999.0683.
- Okin, Daniel, y Ruslan Medzhitov. 2012. «Evolution of Inflammatory Diseases». *Current Biology: CB* 22 (17): R733-740. doi:10.1016/j.cub.2012.07.029.
- Ono, K., T. Ohtomo, K. Yoshida, Y. Yoshimura, S. Kawai, Y. Koishihara, S. Ozaki, M. Kosaka, y M. Tsuchiya. 1999. «The Humanized Anti-HM1.24 Antibody Effectively Kills Multiple Myeloma Cells by Human Effector Cell-Mediated Cytotoxicity». *Molecular Immunology* 36 (6): 387-95.
- Ozaki, S., M. Kosaka, S. Wakatsuki, M. Abe, Y. Koishihara, y T. Matsumoto. 1997. «Immunotherapy of Multiple Myeloma with a Monoclonal Antibody Directed against a Plasma Cell-Specific Antigen, HM1.24». *Blood* 90 (8): 3179-86.
- Paria, Biman C., Stephen M. Vogel, Gias U. Ahmmed, Setara Alamgir, Jennifer Shroff, Asrar B. Malik, y Chinnaswamy Tiruppathi. 2004. «Tumor Necrosis Factor-Alpha-Induced TRPC1 Expression Amplifies Store-Operated Ca²⁺ Influx and Endothelial Permeability». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 287 (6): L1303-1313. doi:10.1152/ajplung.00240.2004.
- Peifer, M., L. M. Pai, y M. Casey. 1994. «Phosphorylation of the Drosophila Adherens Junction Protein Armadillo: Roles for Wingless Signal and Zeste-White 3 Kinase». *Developmental Biology* 166 (2): 543-56. doi:10.1006/dbio.1994.1336.
- Petäjä, Jari. 2011. «Inflammation and Coagulation. An Overview». *Thrombosis Research* 127 Suppl 2 (enero): S34-37. doi:10.1016/S0049-3848(10)70153-5.
- Petrache, I., A. D. Verin, M. T. Crow, A. Birukova, F. Liu, y J. G. Garcia. 2001. «Differential Effect of MLC Kinase in TNF-Alpha-Induced Endothelial Cell Apoptosis and Barrier Dysfunction». *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 280 (6): L1168-1178.
- Phan, Quynh T., David K. Eng, Serge Mostowy, Hyunsook Park, Pascale Cossart, y Scott G. Filler. 2013. «Role of Endothelial Cell Septin 7 in the Endocytosis of Candida Albicans». *mBio* 4 (6): e00542-00513. doi:10.1128/mBio.00542-13.
- Pober, J. S., y R. S. Cotran. 1990. «Cytokines and Endothelial Cell Biology». *Physiological Reviews* 70 (2): 427-51.
- Pober, J. S., L. A. Lapierre, A. H. Stolpen, T. A. Brock, T. A. Springer, W. Fiers, M. P. Bevilacqua, D. L. Mendrick, y M. A. Gimbrone. 1987. «Activation of Cultured Human

Endothelial Cells by Recombinant Lymphotoxin: Comparison with Tumor Necrosis Factor and Interleukin 1 Species». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 138 (10): 3319-24.

Popović, Milan, Katarina Smiljanić, Branislava Dobutović, Tatiana Syrovets, Thomas Simmet, y Esma R. Isenović. 2012. «Thrombin and Vascular Inflammation». *Molecular and Cellular Biochemistry* 359 (1-2): 301-13. doi:10.1007/s11010-011-1024-x.

Potter, Matthew D., Simone Barbero, y David A. Cheresh. 2005. «Tyrosine Phosphorylation of VE-Cadherin Prevents Binding of p120- and Beta-Catenin and Maintains the Cellular Mesenchymal States». *The Journal of Biological Chemistry* 280 (36): 31906-12. doi:10.1074/jbc.M505568200.

Price, L. S., J. Leng, M. A. Schwartz, y G. M. Bokoch. 1998. «Activation of Rac and Cdc42 by Integrins Mediates Cell Spreading». *Molecular Biology of the Cell* 9 (7): 1863-71.

Qian, Li-Wu, Whitney Greene, Fengchun Ye, y Shou-Jiang Gao. 2008. «Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Disrupts Adherens Junctions and Increases Endothelial Permeability by Inducing Degradation of VE-Cadherin». *Journal of Virology* 82 (23): 11902-12. doi:10.1128/JVI.01042-08.

Rapaport, Debora, Wojtek Auerbach, Naava Naslavsky, Metsada Pasmanik-Chor, Emilia Galperin, Amos Fein, Steve Caplan, Alexandra L. Joyner, y Mia Horowitz. 2006. «Recycling to the Plasma Membrane Is Delayed in EHD1 Knockout Mice». *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 7 (1): 52-60. doi:10.1111/j.1600-0854.2005.00359.x.

Reglero-Real, Natalia, Adrián Alvarez-Varela, Eva Cernuda-Morollón, Jorge Feito, Beatriz Marcos-Ramiro, Laura Fernández-Martín, Maria José Gómez-Lechón, et al. 2014. «Apicobasal Polarity Controls Lymphocyte Adhesion to Hepatic Epithelial Cells». *Cell Reports* 8 (6): 1879-93. doi:10.1016/j.celrep.2014.08.007.

Reglero-Real, Natalia, Diego García-Weber, y Jaime Millán. 2016. «Cellular Barriers after Extravasation: Leukocyte Interactions with Polarized Epithelia in the Inflamed Tissue». *Mediators of Inflammation* 2016: 7650260. doi:10.1155/2016/7650260.

Reglero-Real, Natalia, Beatriz Marcos-Ramiro, y Jaime Millán. 2012. «Endothelial Membrane Reorganization during Leukocyte Extravasation». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (18): 3079-99. doi:10.1007/s00018-012-0987-4.

Reinke, J. M., y H. Sorg. 2012. «Wound Repair and Regeneration». *European Surgical Research. Europäische Chirurgische Forschung. Recherches Chirurgicales Européennes* 49 (1): 35-43. doi:10.1159/000339613.

Ren, X. D., y M. A. Schwartz. 2000. «Determination of GTP Loading on Rho». *Methods in Enzymology* 325: 264-72.

Ridley, A. 2000. «Rho GTPases. Integrating Integrin Signaling». *The Journal of Cell Biology* 150 (4): F107-109.

- Ridley, A. J. 1995. «Rho-Related Proteins: Actin Cytoskeleton and Cell Cycle». *Current Opinion in Genetics & Development* 5 (1): 24-30.
- Ridley, A. J. 2013. «RhoA, RhoB and RhoC Have Different Roles in Cancer Cell Migration». *Journal of Microscopy* 251 (3): 242-49. doi:10.1111/jmi.12025.
- Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann, y A. Hall. 1992. «The Small GTP-Binding Protein Rac Regulates Growth Factor-Induced Membrane Ruffling». *Cell* 70 (3): 401-10.
- Ridley, Anne J. 2006. «Rho GTPases and Actin Dynamics in Membrane Protrusions and Vesicle Trafficking». *Trends in Cell Biology* 16 (10): 522-29. doi:10.1016/j.tcb.2006.08.006.
- Robak, T., A. Gladalska, y H. Stepień. 1998. «The Tumour Necrosis Factor Family of Receptors/Ligands in the Serum of Patients with Rheumatoid Arthritis». *European Cytokine Network* 9 (2): 145-54.
- Rollason, Ruth, Viktor Korolchuk, Clare Hamilton, Mark Jepson, y George Banting. 2009. «A CD317/Tetherin-RICH2 Complex Plays a Critical Role in the Organization of the Subapical Actin Cytoskeleton in Polarized Epithelial Cells». *The Journal of Cell Biology* 184 (5): 721-36. doi:10.1083/jcb.200804154.
- Rollason, Ruth, Viktor Korolchuk, Clare Hamilton, Peter Schu, y George Banting. 2007. «Clathrin-Mediated Endocytosis of a Lipid-Raft-Associated Protein Is Mediated through a Dual Tyrosine Motif». *Journal of Cell Science* 120 (Pt 21): 3850-58. doi:10.1242/jcs.003343.
- Romer, L. H., N. V. McLean, H. C. Yan, M. Daise, J. Sun, y H. M. DeLisser. 1995. «IFN-Gamma and TNF-Alpha Induce Redistribution of PECAM-1 (CD31) on Human Endothelial Cells». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 154 (12): 6582-92.
- Romero, Steven A., Jennifer L. McCord, Matthew R. Ely, Dylan C. Sieck, Tahisha M. Buck, Meredith J. Luttrell, David A. MacLean, y John R. Halliwill. 2016. «Mast Cell Degranulation and de Novo Histamine Formation Contribute to Sustained Post-Exercise Vasodilation in Humans». *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)*, agosto, jap.00633.2016. doi:10.1152/japplphysiol.00633.2016.
- Roux, Kyle J., Dae In Kim, Manfred Raida, y Brian Burke. 2012. «A Promiscuous Biotin Ligase Fusion Protein Identifies Proximal and Interacting Proteins in Mammalian Cells». *The Journal of Cell Biology* 196 (6): 801-10. doi:10.1083/jcb.201112098.
- Rudders, S., J. Gaspar, R. Madore, C. Volland, F. Grall, A. Patel, A. Pellacani, M. A. Perrella, T. A. Libermann, y P. Oettgen. 2001. «ESE-1 Is a Novel Transcriptional Mediator of Inflammation That Interacts with NF-Kappa B to Regulate the Inducible Nitric-Oxide Synthase Gene». *The Journal of Biological Chemistry* 276 (5): 3302-9. doi:10.1074/jbc.M006507200.
- Rudolf Virchow. 1858. *Cellular pathology, as based upon physiological and pathological histology. Twenty lectures delivered in the Pathological institute of Berlin during the months of February, March and April, 1858*. New York, R. M. De Witt.

- Sandilands, Emma, Christophe Cans, Valerie J. Fincham, Valerie G. Brunton, Harry Mellor, George C. Prendergast, Jim C. Norman, Giulio Superti-Furga, y Margaret C. Frame. 2004. «RhoB and Actin Polymerization Coordinate Src Activation with Endosome-Mediated Delivery to the Membrane». *Developmental Cell* 7 (6): 855-69. doi:10.1016/j.devcel.2004.09.019.
- Sauteur, Loïc, Markus Affolter, y Heinz-Georg Belting. 2017. «Distinct and Redundant Functions of Esam and VE-Cadherin during Vascular Morphogenesis». *Development (Cambridge, England)*, marzo. doi:10.1242/dev.140038.
- Sawant, Devendra A., Binu Tharakan, Ashton Adekanbi, Felicia A. Hunter, William Roy Smythe, y Ed W. Childs. 2011. «Inhibition of VE-Cadherin Proteasomal Degradation Attenuates Microvascular Hyperpermeability». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 18 (1): 46-55. doi:10.1111/j.1549-8719.2010.00067.x.
- Schaible, Hans-Georg, Andrea Ebersberger, y Gabriel Natura. 2011. «Update on Peripheral Mechanisms of Pain: Beyond Prostaglandins and Cytokines». *Arthritis Research & Therapy* 13 (2): 210. doi:10.1186/ar3305.
- Schlegel, Nicolas, y Jens Waschke. 2009. «Impaired cAMP and Rac 1 Signaling Contribute to TNF-Alpha-Induced Endothelial Barrier Breakdown in Microvascular Endothelium». *Microcirculation (New York, N.Y.: 1994)* 16 (6): 521-33. doi:10.1080/10739680902967427.
- Schlegel, Nicolas y Jens Waschke. 2014. «cAMP with Other Signaling Cues Converges on Rac1 to Stabilize the Endothelial Barrier- a Signaling Pathway Compromised in Inflammation». *Cell and Tissue Research* 355 (3): 587-96. doi:10.1007/s00441-013-1755-y.
- Schulz, Beate, Jessica Pruessmeyer, Thorsten Maretzky, Andreas Ludwig, Carl P. Blobel, Paul Saftig, y Karina Reiss. 2008. «ADAM10 Regulates Endothelial Permeability and T-Cell Transmigration by Proteolysis of Vascular Endothelial Cadherin». *Circulation Research* 102 (10): 1192-1201. doi:10.1161/CIRCRESAHA.107.169805.
- Sender, Ron, Shai Fuchs, y Ron Milo. 2016. «Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body». *PLOS Biology* 14 (8): e1002533. doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
- Serhan, Charles N., y John Savill. 2005. «Resolution of Inflammation: The Beginning Programs the End». *Nature Immunology* 6 (12): 1191-97. doi:10.1038/ni1276.
- Shao, Feng, y Jack E. Dixon. 2003. «YopT Is a Cysteine Protease Cleaving Rho Family GTPases». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 529: 79-84. doi:10.1007/0-306-48416-1_14.
- Sharma, Mahak, Sai Srinivas Panapakkam Giridharan, Juliati Rahajeng, Naava Naslavsky, y Steve Caplan. 2009. «MICAL-L1 Links EHD1 to Tubular Recycling Endosomes and Regulates Receptor Recycling». *Molecular Biology of the Cell* 20 (24): 5181-94. doi:10.1091/mbc.E09-06-0535.

- Sieweke, Michael H, Hildegard Tekotte, Jonathan Frampton, y Thomas Graf. 1996. «MafB Is an Interaction Partner and Repressor of Ets-1 That Inhibits Erythroid Differentiation». *Cell* 85 (1): 49-60. doi:10.1016/S0092-8674(00)81081-8.
- Simionescu, M. 2000. «Morphogenesis of endothelium Ch. 1». En , eds Risau, W. & Rubanyi, G. M., 1–21. Harwood Academic, Amsterdam.
- Singer, Mervyn, Clifford S. Deutschman, Christopher Warren Seymour, Manu Shankar-Hari, Djillali Annane, Michael Bauer, Rinaldo Bellomo, et al. 2016. «The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)». *JAMA* 315 (8): 801-10. doi:10.1001/jama.2016.0287.
- Spagnuolo, Raffaella, Monica Corada, Fabrizio Orsenigo, Lucia Zanetta, Ulrich Deuschle, Peter Sandy, Claudio Schneider, Christopher J. Drake, Ferruccio Breviario, y Elisabetta Dejana. 2004. «Gas1 Is Induced by VE-Cadherin and Vascular Endothelial Growth Factor and Inhibits Endothelial Cell Apoptosis». *Blood* 103 (8): 3005-12. doi:10.1182/blood-2003-07-2459.
- Stähli, Barbara E., Giovanni G. Camici, Jan Steffel, Alexander Akhmedov, Kushiar Shojaati, Michelle Graber, Thomas F. Lüscher, y Felix C. Tanner. 2006. «Paclitaxel Enhances Thrombin-Induced Endothelial Tissue Factor Expression via c-Jun Terminal NH2 Kinase Activation». *Circulation Research* 99 (2): 149-55. doi:10.1161/01.RES.0000233379.92010.fd.
- Steenkamp, Emma T., Jane Wright, y Sandra L. Baldauf. 2006. «The Protistan Origins of Animals and Fungi». *Molecular Biology and Evolution* 23 (1): 93-106. doi:10.1093/molbev/msj011.
- Stolpen, A. H., E. C. Guinan, W. Fiers, y J. S. Pober. 1986. «Recombinant Tumor Necrosis Factor and Immune Interferon Act Singly and in Combination to Reorganize Human Vascular Endothelial Cell Monolayers». *The American Journal of Pathology* 123 (1): 16-24.
- Su, Wenji, y Andrew P. Kowalczyk. 2017. «The VE-Cadherin Cytoplasmic Domain Undergoes Proteolytic Processing during Endocytosis». *Molecular Biology of the Cell* 28 (1): 76-84. doi:10.1091/mbc.E16-09-0658.
- Sullivan, David P., y William A. Muller. 2014. «Neutrophil and Monocyte Recruitment by PECAM, CD99, and Other Molecules via the LBRC». *Seminars in Immunopathology* 36 (2): 193-209. doi:10.1007/s00281-013-0412-6.
- Sun, Zuyue, Xiujuan Li, Sara Massena, Simone Kutschera, Narendra Padhan, Laura Gualandi, Vibeke Sundvold-Gjerstad, et al. 2012. «VEGFR2 Induces c-Src Signaling and Vascular Permeability in Vivo via the Adaptor Protein TSA α ». *The Journal of Experimental Medicine* 209 (7): 1363-77. doi:10.1084/jem.20111343.
- Takeichi, M. 1990. «Cadherins: A Molecular Family Important in Selective Cell-Cell Adhesion». *Annual Review of Biochemistry* 59: 237-52. doi:10.1146/annurev.bi.59.070190.001321.

- Takesono, Aya, Sarah J. Heasman, Beata Wojciak-Stothard, Ritu Garg, y Anne J. Ridley. 2010. «Microtubules Regulate Migratory Polarity through Rho/ROCK Signaling in T Cells». *PLoS One* 5 (1): e8774. doi:10.1371/journal.pone.0008774.
- Tang, Vivian W., y William M. Briher. 2012. « α -Actinin-4/FSGS1 Is Required for Arp2/3-Dependent Actin Assembly at the Adherens Junction». *The Journal of Cell Biology* 196 (1): 115-30. doi:10.1083/jcb.201103116.
- Taveau, Jean-Christophe, Mathilde Dubois, Olivier Le Bihan, Sylvain Trépout, Sébastien Almagro, Elizabeth Hewat, Claire Durmort, Stéphanie Heyraud, Danielle Gulino-Debrac, y Olivier Lambert. 2008. «Structure of Artificial and Natural VE-Cadherin-Based Adherens Junctions». *Biochemical Society Transactions* 36 (Pt 2): 189-93. doi:10.1042/BST0360189.
- Tokarev, Andrey A., Jason Munguia, y John C. Guatelli. 2011. «Serine-Threonine Ubiquitination Mediates Downregulation of BST-2/Tetherin and Relief of Restricted Virion Release by HIV-1 Vpu». *Journal of Virology* 85 (1): 51-63. doi:10.1128/JVI.01795-10.
- Tokarev, Andrey, Marissa Suarez, Wilson Kwan, Kathleen Fitzpatrick, Rajendra Singh, y John Guatelli. 2013. «Stimulation of NF- κ B Activity by the HIV Restriction Factor BST2». *Journal of Virology* 87 (4): 2046-57. doi:10.1128/JVI.02272-12.
- Tyler, Seth. 2003. «Epithelium--the Primary Building Block for Metazoan Complexity». *Integrative and Comparative Biology* 43 (1): 55-63. doi:10.1093/icb/43.1.55.
- Ueki, Takeshi, Kana Iwasawa, Hiroyuki Ishikawa, y Yoshihiko Sawa. 2008. «Expression of Junctional Adhesion Molecules on the Human Lymphatic Endothelium». *Microvascular Research* 75 (2): 269-78. doi:10.1016/j.mvr.2007.07.005.
- Ukropec, J. A., M. K. Hollinger, S. M. Salva, y M. J. Woolkalis. 2000. «SHP2 Association with VE-Cadherin Complexes in Human Endothelial Cells Is Regulated by Thrombin». *The Journal of Biological Chemistry* 275 (8): 5983-86.
- Van Damme, Nanette, Daniel Goff, Chris Katsura, Rebecca L. Jorgenson, Richard Mitchell, Marc C. Johnson, Edward B. Stephens, y John Guatelli. 2008. «The Interferon-Induced Protein BST-2 Restricts HIV-1 Release and Is Downregulated from the Cell Surface by the Viral Vpu Protein». *Cell Host & Microbe* 3 (4): 245-52. doi:10.1016/j.chom.2008.03.001.
- Vandenabeele, Peter, Lorenzo Galluzzi, Tom Vanden Berghe, y Guido Kroemer. 2010. «Molecular Mechanisms of Necroptosis: An Ordered Cellular Explosion». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (10): 700-714. doi:10.1038/nrm2970.
- Vandenbroucke, Emily, Dolly Mehta, Richard Minshall, y Asrar B. Malik. 2008. «Regulation of Endothelial Junctional Permeability». *Annals of the New York Academy of Sciences* 1123 (marzo): 134-45. doi:10.1196/annals.1420.016.
- Vasilaki, Eleftheria, Elsa Papadimitriou, Virginia Tajadura, Anne J. Ridley, Christos Stournaras, y Dimitris Kardassis. 2010. «Transcriptional Regulation of the Small GTPase RhoB Gene by TGF β -Induced Signaling Pathways». *FASEB Journal: Official Publication*

of the Federation of American Societies for Experimental Biology 24 (3): 891-905. doi:10.1096/fj.09-134742.

Vega, Francisco M., Gilbert Fruhwirth, Tony Ng, y Anne J. Ridley. 2011. «RhoA and RhoC Have Distinct Roles in Migration and Invasion by Acting through Different Targets». *The Journal of Cell Biology* 193 (4): 655-65. doi:10.1083/jcb.201011038.

Vega, Francisco M., y Anne J. Ridley. 2008. «Rho GTPases in Cancer Cell Biology». *FEBS Letters* 582 (14): 2093-2101. doi:10.1016/j.febslet.2008.04.039.

Vega, Francisco M., Mairian Thomas, Nicolas Reymond, y Anne J. Ridley. 2015. «The Rho GTPase RhoB Regulates Cadherin Expression and Epithelial Cell-Cell Interaction». *Cell Communication and Signaling: CCS* 13 (enero): 6. doi:10.1186/s12964-015-0085-y.

Viemann, Dorothee, Matthias Goebeler, Sybille Schmid, Kerstin Klimmek, Clemens Sorg, Stephan Ludwig, y Johannes Roth. 2004. «Transcriptional Profiling of IKK2/NF-Kappa B- and p38 MAP Kinase-Dependent Gene Expression in TNF-Alpha-Stimulated Primary Human Endothelial Cells». *Blood* 103 (9): 3365-73. doi:10.1182/blood-2003-09-3296.

Viemann, Dorothee, Matthias Goebeler, Sybille Schmid, Ursula Nordhues, Kerstin Klimmek, Clemens Sorg, y Johannes Roth. 2006. «TNF Induces Distinct Gene Expression Programs in Microvascular and Macrovascular Human Endothelial Cells». *Journal of Leukocyte Biology* 80 (1): 174-85. doi:10.1189/jlb.0905530.

Vogel, S. M., X. Gao, D. Mehta, R. D. Ye, T. A. John, P. Andrade-Gordon, C. Tiruppathi, y A. B. Malik. 2000. «Abrogation of Thrombin-Induced Increase in Pulmonary Microvascular Permeability in PAR-1 Knockout Mice». *Physiological Genomics* 4 (2): 137-45.

Vouret-Craviari, V., P. Boquet, J. Pouyssegur, y E. Van Obberghen-Schilling. 1998. «Regulation of the Actin Cytoskeleton by Thrombin in Human Endothelial Cells: Role of Rho Proteins in Endothelial Barrier Function». *Molecular Biology of the Cell* 9 (9): 2639-53.

Wallar, Bradley J., Aaron D. Deward, James H. Resau, y Arthur S. Alberts. 2007. «RhoB and the Mammalian Diaphanous-Related Formin mDia2 in Endosome Trafficking». *Experimental Cell Research* 313 (3): 560-71. doi:10.1016/j.yexcr.2006.10.033.

Waltenberger, J., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, M. Shibuya, y C. H. Heldin. 1994. «Different Signal Transduction Properties of KDR and Flt1, Two Receptors for Vascular Endothelial Growth Factor». *The Journal of Biological Chemistry* 269 (43): 26988-95.

Wang, Tuanlao, Zhang Ming, Wu Xiaochun, y Wanjin Hong. 2011. «Rab7: Role of Its Protein Interaction Cascades in Endo-Lysosomal Traffic». *Cellular Signalling* 23 (3): 516-21. doi:10.1016/j.cellsig.2010.09.012.

Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki, y S. Narumiya. 1999. «Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-Induced Actin Reorganization». *Nature Cell Biology* 1 (3): 136-43. doi:10.1038/11056.

- Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B. M. Jockusch, y S. Narumiya. 1997. «p140mDia, a Mammalian Homolog of Drosophila Diaphanous, Is a Target Protein for Rho Small GTPase and Is a Ligand for Profilin». *The EMBO Journal* 16 (11): 3044-56. doi:10.1093/emboj/16.11.3044.
- Weaver, Casey T., y Robin D. Hatton. 2009. «Interplay between the TH17 and TReg Cell Lineages: A (Co-)Evolutionary Perspective». *Nature Reviews. Immunology* 9 (12): 883-89. doi:10.1038/nri2660.
- Weber, Christian, Line Fraemohs, y Elisabetta Dejana. 2007. «The Role of Junctional Adhesion Molecules in Vascular Inflammation». *Nature Reviews. Immunology* 7 (6): 467-77. doi:10.1038/nri2096.
- Weernink, Paschal A. Oude, Konstantinos Meletiadis, Silvia Hommeltenberg, Matthias Hinz, Hisamitsu Ishihara, Martina Schmidt, y Karl H. Jakobs. 2004. «Activation of Type I Phosphatidylinositol 4-Phosphate 5-Kinase Isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42». *The Journal of Biological Chemistry* 279 (9): 7840-49. doi:10.1074/jbc.M312737200.
- Wei, Lei, Kyoko Imanaka-Yoshida, Lu Wang, Song Zhan, Michael D. Schneider, Francesco J. DeMayo, y Robert J. Schwartz. 2002. «Inhibition of Rho Family GTPases by Rho GDP Dissociation Inhibitor Disrupts Cardiac Morphogenesis and Inhibits Cardiomyocyte Proliferation». *Development (Cambridge, England)* 129 (7): 1705-14.
- Wennerberg, Krister, y Channing J. Der. 2004. «Rho-Family GTPases: It's Not Only Rac and Rho (and I like It)». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 8): 1301-12. doi:10.1242/jcs.01118.
- Wheeler, Ann P., y Anne J. Ridley. 2004. «Why Three Rho Proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and Cell Motility». *Experimental Cell Research* 301 (1): 43-49. doi:10.1016/j.yexcr.2004.08.012.
- Wheeler, Ann P. y Anne J. Ridley. 2007. «RhoB Affects Macrophage Adhesion, Integrin Expression and Migration». *Experimental Cell Research* 313 (16): 3505-16. doi:10.1016/j.yexcr.2007.07.014.
- Wherlock, Matthew, Alexandra Gampel, Clare Futter, y Harry Mellor. 2004. «Farnesyltransferase Inhibitors Disrupt EGF Receptor Traffic through Modulation of the RhoB GTPase». *Journal of Cell Science* 117 (Pt 15): 3221-31. doi:10.1242/jcs.01193.
- Wójciak-Stothard, B., A. Entwistle, R. Garg, y A. J. Ridley. 1998. «Regulation of TNF-Alpha-Induced Reorganization of the Actin Cytoskeleton and Cell-Cell Junctions by Rho, Rac, and Cdc42 in Human Endothelial Cells». *Journal of Cellular Physiology* 176 (1): 150-65. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(199807)176:1<150::AID-JCP17>3.0.CO;2-B.
- Wójciak-Stothard, B., S. Potempa, T. Eichholtz, y A. J. Ridley. 2001. «Rho and Rac but Not Cdc42 Regulate Endothelial Cell Permeability». *Journal of Cell Science* 114 (Pt 7): 1343-55.
- Wojciak-Stothard, Beata, y Anne J. Ridley. 2002. «Rho GTPases and the Regulation of Endothelial Permeability». *Vascular Pharmacology* 39 (4-5): 187-99.

- Xiao, Kanyan, David F. Allison, Kathleen M. Buckley, Margaret D. Kottke, Peter A. Vincent, Victor Faundez, y Andrew P. Kowalczyk. 2003. «Cellular Levels of p120 Catenin Function as a Set Point for Cadherin Expression Levels in Microvascular Endothelial Cells». *The Journal of Cell Biology* 163 (3): 535-45. doi:10.1083/jcb.200306001.
- Xiao, Kanyan, David F. Allison, Margaret D. Kottke, Susan Summers, George P. Sorescu, Victor Faundez, y Andrew P. Kowalczyk. 2003. «Mechanisms of VE-Cadherin Processing and Degradation in Microvascular Endothelial Cells». *The Journal of Biological Chemistry* 278 (21): 19199-208. doi:10.1074/jbc.M211746200.
- Xiao, Kanyan, Jennifer Garner, Kathleen M. Buckley, Peter A. Vincent, Christine M. Chiasson, Elisabetta Dejana, Victor Faundez, y Andrew P. Kowalczyk. 2005. «p120-Catenin Regulates Clathrin-Dependent Endocytosis of VE-Cadherin». *Molecular Biology of the Cell* 16 (11): 5141-51. doi:10.1091/mbc.E05-05-0440.
- Yan, Zhibo, Zhen-Guo Wang, Nava Segev, Sanyuan Hu, Richard D. Minshall, Randal O. Dull, Meihong Zhang, Asrar B. Malik, y Guochang Hu. 2016. «Rab11a Mediates Vascular Endothelial-Cadherin Recycling and Controls Endothelial Barrier Function». *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 36 (2): 339-49. doi:10.1161/ATVBAHA.115.306549.
- Yang, Junjun, Wei Yao, Guisheng Qian, Zhenghua Wei, Guangyu Wu, y Guansong Wang. 2015. «Rab5-Mediated VE-Cadherin Internalization Regulates the Barrier Function of the Lung Microvascular Endothelium». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 72 (24): 4849-66. doi:10.1007/s00018-015-1973-4.
- Yang, N., O. Higuchi, K. Ohashi, K. Nagata, A. Wada, K. Kangawa, E. Nishida, y K. Mizuno. 1998. «Cofilin Phosphorylation by LIM-Kinase 1 and Its Role in Rac-Mediated Actin Reorganization». *Nature* 393 (6687): 809-12. doi:10.1038/31735.
- Yang, Yun-Chiu, Pei-Ni Chen, Siou-Yu Wang, Chen-Yi Liao, Yu-Ying Lin, Shih-Rhong Sun, Chun-Ling Chiu, Yih-Shou Hsieh, Jia-Ching Shieh, y Jinghua Tsai Chang. 2015. «The Differential Roles of Slit2-Exon 15 Splicing Variants in Angiogenesis and HUVEC Permeability». *Angiogenesis* 18 (3): 301-12. doi:10.1007/s10456-015-9467-4.
- Yudowski, Guillermo A., Manojkumar A. Puthenveedu, Anastasia G. Henry, y Mark von Zastrow. 2009. «Cargo-Mediated Regulation of a Rapid Rab4-Dependent Recycling Pathway». *Molecular Biology of the Cell* 20 (11): 2774-84. doi:10.1091/mbc.E08-08-0892.
- Zhao, Helong, Appakkudal R. Anand, y Ramesh K. Ganju. 2014. «Slit2-Robo4 Pathway Modulates Lipopolysaccharide-Induced Endothelial Inflammation and Its Expression Is Dysregulated during Endotoxemia». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 192 (1): 385-93. doi:10.4049/jimmunol.1302021.
- Zimmerman, G. A., M. R. Elstad, D. E. Lorant, T. M. McIntyre, S. M. Prescott, M. K. Topham, A. S. Weyrich, y R. E. Whatley. 1996. «Platelet-Activating Factor (PAF): Signalling and Adhesion in Cell-Cell Interactions». *Advances in Experimental Medicine and Biology* 416: 297-304.

Zughaier, Susu M. 2011. «Neisseria Meningitidis Capsular Polysaccharides Induce Inflammatory Responses via TLR2 and TLR4-MD-2». *Journal of Leukocyte Biology* 89 (3): 469-80. doi:10.1189/jlb.0610369.

ANEXO

Publicaciones

- García-Weber, D., and Millán, J. (2016). Parallels between single cell migration and barrier formation: the case of RhoB and Rac1 trafficking. **Small GTPases**. Sep 6:1-7.

- Marcos-Ramiro, B., García-Weber, D., Barroso, S., Feito, J., Ortega, M.C., Cernuda-Morollón, E., Reglero-Real, N., Fernández-Martín, L., Durán, M.C., Alonso, M.A., et al. (2016). RhoB controls endothelial barrier recovery by inhibiting Rac1 trafficking to the cell border. **J. Cell Biol.** 213, 385–402.

- Reglero-Real, N*, García-Weber, D.*, and Millán, J. (2016). Cellular Barriers after Extravasation: Leukocyte Interactions with Polarized Epithelia in the Inflamed Tissue. **Mediators Inflamm.** 2016, 7650260.

- Marcos-Ramiro, B*, García-Weber, D.*, and Millán, J. (2014). TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. **Thromb. Haemost.** 112, 1088–1102.

*** Primer autor compartido**